

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Benátská 2

128 01 Praha 2

**Využití kroužkovce *Tubifex tubifex* Müll. jako modelu
pro testování biologické aktivity**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vedoucí disertační práce: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Praha 2010

Mgr. Jitka Vytlačilová

Moji milou povinností je poděkovat vedoucímu disertační práce panu Prof. RNDr. Ludku Jahodářovi, CSc. za velmi cenné připomínky k mé práci, odborné vedení v průběhu mého studia a pomoc při sestavování práce. Zároveň nemohu opomenout poděkovat všem pracovníkům Ústavu pro životní prostředí za příjemnou přátelskou atmosféru, zejména Prof. RNDr. Martinu Branišovi, CSc., za vstřícnost a otevřenost při konzultacích.

Můj dík patří také celé mé rodině, která mne byla po celou dobu studia a sepisování disertační práce velkou morální oporou.

Za finanční podporu děkuji grantům Univerzity Karlovy v Praze č. 158/2003/B-BIO/FaF (1 letý) a č. 105 407 PŘF UK (3 letý).

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Zároveň prohlašuji, že jsem nepředložila tuto disertační práci, ani její podstatnou část k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré informace budou řádně citovány.

V Praze, květen 2010

Mgr. Jitka Vytlačilová

1. Abstrakt

Záměrem předložené disertační práce bylo využití kroužkovce *Tubifex tubifex* jako modelu pro testování biologické aktivity. Nítěnka byla v této studii použita pro hodnocení fotosenzibilizace, tj. zcitlivění organismu vůči UVA záření (365 nm; hustota zářivého toku $350 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) po styku s určitými látkami.

Testované látky zahrnovaly jednak prokázané fotosenzibilizátory: bengálskou červeň khelin a xantotoxin. Dále přírodní izolované látky – thiofenový polyyn, umbelliferon, skopolin, skopoletin. Zástupce syntetických látek – salicylanilidy a thiosalicylanilidy a léčiva penicilinového typu Augmentin, Ospamox a jejich standard účinné látky amoxicilin. Závěrečné zhodnocení fotosenzibilizačních vlastností látek bylo provedeno dle Směrnice komise 2000/33/ES pro FOTOTOXICITY – ZKOUŠKY FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*.

Test probíhal ve 24jamkových destičkách. Kdy jedna sada destiček s fotosenzibilizátorem byla ozařována a druhá sada byla po celou dobu experimentu umístěna v termostatu ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) bez přítomnosti světla jako temnostní kontrola. Vyhodnocení probíhalo ihned po zvolené době ozařování (15, 30, 45, 60, 120, 240 min). Jako endpointy byla navržena mortalita a procento poškozených jedinců.

Mezi prokázanými fotosenzibilizátory byl dosažen nejvyšší PIF faktor (5,72) u bengálské červeně po 30 min ozařování a při hodnocení mortality. Pro další experimenty byla určena jako pozitivní kontrola. V dalších časech ozařování (60, 120, 240 min) byly dosaženy $\text{PIF} < 5$. Nejvyšší PIF faktor, ze všech testovaných látek, byl zjištěn u thiofenového polyynu. Při hodnocení mortality po 60 minutách ozařování byl dosažen $\text{PIF} = 28,15$ a při 120 minutách ozařování $\text{PIF} = 57,5$. Při výpočtu procenta poškozených jedinců byly získány hodnoty nižší – pro 60 minutovou expozici $\text{PIF} = 7,50$ a pro 120 min expozici $\text{PIF} = 18,57$. Ostatní testované látky vykazovaly výrazně menší fotoiritační faktor. Khellin – mortalita a procento poškozených jedinců $\text{PIF} < 2$. U xantotoxinu bylo zjištěno pouze procento poškozených jedinců a $\text{PIF} < 1,5$. U umbelliferonu a skopolinu nebyla zaznamenána mortalita ani poškození. Pouze u skopoletinu bylo pozorováno 33 % poškozených

jedinců při ozařování 120 minut. 4',5-dibromsalicylanilid vykazoval pouze mortalitu s PIF < 2. U základního thiosalicylanilidu byla zjištěna pouze mortalita a PIF < 2. V případě různých substitucí thiosalicylanilidu (4'-methylthiosalicylanilid, 5-chlorthiosalicylanilid, 3',4'-dichlorthiosalicylanilid, 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid, 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid) se pohyboval PIF < 1 pro hodnocení mortality. Poškození nítěnek bylo zaznamenáno pouze v případě 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid, 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid. Standard účinné látky (amoxicilin) po 30 min ozařování vykázal pouze mortalitu a PIF = 1,14. Léčiva Augmentin PIF = 0,35 a léčivo Ospamox PIF = 0,82 rovněž pro mortalitu, poškození pozorováno nebylo.

Prezentované výsledky ukazují, že nítěnka větší je vhodným testovacím organismem pro studium potencionálně fototoxických látek. Je dostatečně citlivá na aktivitu fototosenzibilizátoru, zvláště pak látek generujících singletový kyslík.

2. Abstract

The aim of the presented doctoral thesis was to use the sludge worm *Tubifex tubifex* as a model for biological activity testing. In the presented study, the *Tubifex* worm was used to evaluate photosensibilisation, i.e. sensibilisation of an organism towards UVA radiation (365 nm; radiant flux density of $350 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) after contact with certain substances.

The tested substances included proven photosensibilizing agents – rose bengal, khellin and xanthotoxin; isolated natural substances – thiophene polyacetylene umbelliferon, scopolin, and scopoletin; synthetic compounds – salicylanilides and thiosalicylanilides; and penicillin drugs Augmentin and Ospamox and their active substance standard amoxicillin. The final evaluation of photosensibilizing properties of the substances was carried out according to the Commission Directive 2000/33/EC PHOTOTOXICITY – *IN VITRO* 3T3 NRU PHOTOTOXICITY TEST.

The test was performed in 24-well plates where one set of plates with the photosensibilizing agent was irradiated and the second set was placed in an incubator ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) as a dark control without any light presence for the whole period of the experiment. The plates were evaluated immediately after the given period of irradiation (15, 30, 45, 60, 120, and 240 minutes). Mortality and percentual number of damaged individuals were the proposed endpoints

From among the proven photosensibilizing agents, rose bengal showed the highest PIF factor (5.72) in mortality evaluation after 30-minute irradiation. Rose bengal was chosen as positive control for other experiments. PIF < 5 was reached after longer irradiation (60, 120, and 240 minutes). The highest PIF factor of all the tested substances was found in thiophene polyacetylene. When evaluating mortality after 60-minute and 120-minute irradiation, PIF = 28.15 and PIF = 57.5, respectively, were reached. When calculating the percentual number of damaged individuals, lower values were acquired: PIF = 7.50 and PIF = 18.57 for 60- and 120-minute irradiation, respectively. Other tested substances showed markedly lower photoirritation

factor. In khellin, PIF < 2 for mortality and percentual number of damaged individuals was found. Percentual number of damaged individuals only and PIF < 1.5 was found in xanthotoxin. In umbelliferon and scopolin, neither mortality nor damage were observed. In scopoletin only, 33 % of damaged individuals were observed after 120-minute irradiation. 4',5-dibromo-salicylanilide showed mortality only with PIF < 2. Mortality only and PIF < 2 were found in the basic thiosalicylanilide. In various thiosalicylanilide substitutions (4'-methyl-thiosalicylanilide, 5-chloro-thiosalicylanilide, 3',4'-dichloro-thiosalicylanilide, 3,5-dichloro-4'-chloro-thiosalicylanilide, 3,5-dichloro-4'-bromo-thiosalicylanilide), PIF < 1 was found in mortality evaluation. The Tubifex worm damage was observed in 3,5-dichloro-4'-chloro-thiosalicylanilide and 3,5-dichloro-4'-bromo-thiosalicylanilide only. The active substance standard (amoxicillin) showed mortality only after 30-minute irradiation and PIF = 1.14. In medicinal products Augmentin and Ospamox, PIF = 0.35 and PIF = 0.82, respectively, were found for mortality; no damage was observed.

The presented results show that *Tubifex tubifex* is a suitable testing organism for the studies of potentially phototoxic substances. It is sufficiently sensitive to the activity of the photosensibilizing agents, especially to singlet-oxygen generating substances.

Obsah:

1. Abstrakt	3
2. Abstract	5
3. Úvod a cíl práce	10
4. Teoretická část – literární řešerše	12
4.1. Analýza problému	12
4.2. Charakteristika modelového organismu nítěnky větší - <i>Tubifex tubifex</i> Müller, 1774	18
4.2.1 Ekologie a rozšíření	18
4.2.2. Vnější anatomie	20
4.2.3. Trávicí a vylučovací soustava	21
4.2.4. Cévní soustava	22
4.2.5. Nervová soustava a smyslové orgány	22
4.2.6. Rozmnožování a vývoj.....	23
4.3. Využití nítěnky jako modelu biologické aktivity.....	25
4.3.1. Proces dekontaminace, bioakumulace a eliminace těžkých kovů u nítěnky	25
4.3.2. Interakce nítěnky s UV zářením	27
4.3.3. Využití <i>Tubifex tubifex</i> ve srovnávacích studiích s metodami <i>in silico</i>	28
5. Experimentální část	29
5.1. Metodika testování fotosenzibilizátorů	29
5.1.1. Příprava modelového organismu <i>Tubifex tubifex</i>	29
5.1.2. Příprava testovaných látek.....	30
5.1.3. Vlastní testování.....	30
5.1.4. Vyhodnocení výsledků	32
5.1.5. Zhodnocení experimentu a statistické zpracování	32
5.2. Testované látky	32
5.2.1. Látky s prokázanou fotosenzibilizační aktivitou – bengálská červeň, khellin, xantotoxin	33
5.2.1.1. Bengálská červeň	33
5.2.1.2. Khellin	34
5.2.1.3. Xantotoxin.....	34
5.2.2. Izolované aktivní přírodní látky - thiofenový polyyn, umbeliferon, skopolin, skopoletin.....	35
5.2.2.1.Thiofenový polyyn.....	35
5.2.2.2. Umbelliferon, skopolin, skopoletin.....	36
5.2.3. Syntetické látky – salicylanilidy, thiosalicylanilidy	37

5.2.3.1. Salicylanilidy	37
5.2.3.2. Thiosalicylanilidy	38
5.2.4. Léčiva – standard antibiotika: amoxicilin - p.a. (Sigma Aldrich) a léčiva Augmentin a Ospamox	39
5.2.4.1. Amoxicilin	39
5.2.4.2. Augmentin 625 mg	39
5.2.4.3. Ospamox 375 mg/5 ml	40
6. Výsledky	41
6.1. Látky s prokázanou fotosenzibilizací – bengálská červeň, khellin, xantotoxin.....	41
6.1.1. Mikroskopické hodnocení	41
6.1.2. Toxikologické hodnocení	43
6.1.2.1. Bengálská červeň.....	43
6.1.2.2. Khellin	46
6.1.2.3. Xantotoxin	49
6.2. Izolované aktivní přírodní látky- thiofenový polyyn, umbelliferon, skopolin, skopoletin	50
6.2.1. Thiofenový polyyn	50
6.2.2. Umbelliferon, skopoletin, skopolin	53
6.3. Syntetické látky – salicylanilidy (2), thiosalicylanilidy (1+5)	56
6.3.1. Salicylanilidy	56
3',4',5-trichlorsalicylanilid	57
4',5-dibromsalicylanilid	57
6.3.2. Thiosalicylanilidy	58
Thiosalicylanilid	58
4'-methylthiosalicylanilid	60
5-chlorthiosalicylanilid	61
3',4'-dichlorthiosalicylanilid	62
3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid.....	64
3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid	66
6.3.3. Léčiva – standard účinné látky antibiotika (amoxicilin), léčiva Augmentin a Ospamox.....	69
7. Diskuse	71
7.1. Optimalizace metody hodnocení	71
7.2. Testované látky	73
7.2.1. Bengálská červeň.....	73

7.2.2. Khellin.....	73
7.2.3. Xantotoxin.....	74
7.2.4. Thiofenový polyyn.....	75
7.2.5. Jednoduché kumariny – umbelliferon, skopolin a skopoletin	76
7.2.6. Salicylanilidy, thiosalicylanilidy	77
7.2.7. Antibiotika.....	78
7.3. Využití nítěnky pro screening fotosenzibilizátorů v humánní toxikologii a možné využití v ekotoxikologii jako laboratorního testu.....	79
8. Závěr	80
9. Seznam použité literatury	82
10. Seznam příloh	89

3. Úvod a cíl práce

Biologickou aktivitu zkoumané látky lze chápat jako efekt, vzniklý po interakci látky s organismem nebo tkání. Biologická aktivita se prezentuje různými účinky (např. antioxidační, antifungální, antiagregační, fotosenzibilizační apod.). Jedna látka může vykazovat i více účinků, s podobnými nebo různými důsledky.

Příkladem biologické aktivity jsou fotosenzibilizace, tj. zcitlivění organismu vůči slunečnímu záření po styku s určitými látkami. Látky s touto schopností označujeme jako fotodynamické, fototoxické, či fotosenzibilizující. Obecně jde o látky schopné absorbovat a krátkou dobu udržet kvanta světelné energie čímž vznikne aktivovaná molekula fotodynamické látky. Každá takováto látka vyžaduje aktivaci pouze zářením o určité vlnové délce. Nejdestruktivnější je UV záření kratší vlnové délky než 330 nm, molekuly absorbující v této oblasti záření působí na organismus nejzřejměji.

V posledních letech je velmi aktuální hrozba zvýšené koncentrace UV záření, dopadající na zemský povrch, zejména v korelaci s úbytkem ozonové vrstvy ve stratosféře, jakožto přirozeného ochranného štítu Země. Jednou z mnoha cest jak se do budoucna s těmito změnami vyrovnat - je pochopit mechanismus účinku UV záření na biotu a tím podpořit adaptační mechanismy, které by vedly k homeostázi organismů. Ekotoxikologické, farmakologické a toxikologické výzkumy hledají vhodný modelový organismus pro testování biologické aktivity ve spojitosti UV záření. Současně s efektem UV záření je nutné studovat i látky, které mohou negativní působení UV záření zesílit, tzv. fotosenzibilizátory. V souladu s principem konceptu "3R" : snižování, zdokonalování a nahrazování laboratorních zvířat je nutné využívat organismy na fylogeneticky nižším vývojovém stupni.

Jedním ze zajímavých organismů je *Tubifex tubifex*, který je v současné době využíván hlavně při hodnocení biodegradačních či bioakumulačních vlastností látek a jako tzv. indikátor znečištění. Díky jeho kosmopolitnímu rozšíření a tím snadnosti získání by tak mohl doplnit stávající spektrum ekotoxikologických testů - o sledování

vlivu fotosenzibilizujících látek ve spojitosti s UV zářením, vedle využití v humánní toxikologii – při screeningu látek vykazujících fotosenzibilizační aktivitu. Řada xenobiotik v životním prostředí tento efekt vykazuje. Mezi široce rozšířené a používané látky, v tomto směru, patří i léčiva.

Cílem práce bylo:

- Navrhnout a vypracovat metodiku hodnocení biologické aktivity - fotosenzibilizační aktivity látek ve spojitosti s UV zářením, na modelu, využívající bezobratlého máloštetinatce *Tubifex tubifex* Müll.
- Pro studium využít přírodních nebo syntetických látek, které jsou prekurzory léčiv, léčivými látkami a produkty biotransformace léčiv.
- Posoudit aplikaci modelu nítěnky v humánní toxikologii při screeningu fotosenzibilizátorů a současně stanovit podmínky využití v ekotoxikologii jako laboratorního testu, zaměřeného na fotosenzibilizační látky v životním prostředí.

4. Teoretická část – literární rešerše

4.1. Analýza problému

Sluneční záření je naprosto nezbytný předpoklad pro zachování života na Zemi a zároveň je nejvýznamnějším zdrojem energie. Solární radiaci můžeme podle vlnových délek rozdělit do několika oblastí. Většinu biologických účinků má oblast vlnových délek 280-800 nm, přičemž pásmo 280 až 320 nm se nazývá zářením středněvlnným ultrafialovým (UVB), 320 až 400 nm dlouhovlnným ultrafialovým (UVA) a pásmo 400 až 700 nm zářením viditelným (VIS). UVC záření o vlnové délce od 100 do 280 nm se do biosféry nedostává, interreaguje s dvojjadernou molekulou kyslíku za vzniku ozonu. Infračervená radiace (IR) vyšších vlnových délek (2,5-15 μm) má účinky tepelné (Coohill, 1998; Ditrichová et al., 1999).

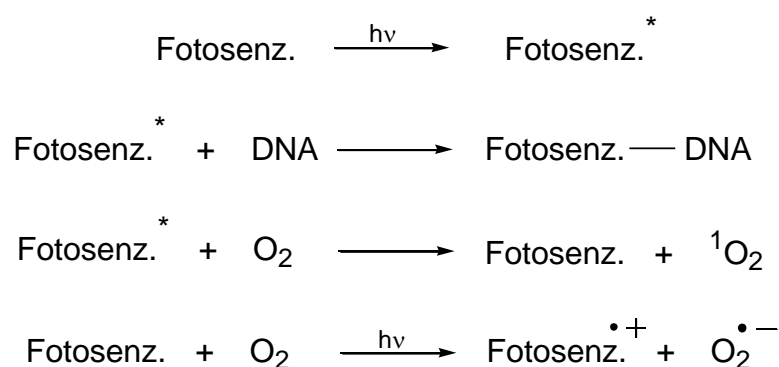
Fototoxicita je definována jako odpověď organismu, vyvolaná kombinací působení některých látek (fotosenzibilizátorů) a následnou expozicí obvykle UV zářením anebo viditelným světlem. K této reakci může dojít již při prvním styku s fotosenzibilizátorem a je závislá jen na překročení prahové dávky radiace a koncentrace příslušné sloučeniny v organismu. Na rozdíl od fotoalergických reakcí zde nehraje zásadní roli imunitní systém, i když u fototoxicity se předpokládá možná účast mediátorů, jako jsou eikonasoidy, histamin nebo komplement (Coohill, 1998; Dubakiene` et al., 2006).

První zmínky o negativním efektu slunečního záření se datují cca 410 p.n.l., kdy Xenophon popisuje pochod 10.000 řeckých vojáků přes hluboký sníh v Arménii, u kterých došlo vlivem nadměrné sluneční expozice ke vzniku sněžné slepoty (Urbach, 1998). V antickém Římě s oblibou odstraňovali své politické protivníky podáním extraktů z třezalky v červeném víně a následnou procházkou po prosluněném pobřeží. Na začátku 20. století byly pozorovány pigmentové skvrny na pokožce žen, které se parfémovaly kolínskou vodou s obsahem bergamotové silice (z bergamotového citrusu). Nedlouho poté byly studovány erytematózní struktury na pokožce osob, které se slunily v trávě (kumariny) po koupání (Ditrichová et al., 1999; Urbach, 1998).

Fotosenzibilizace organismu na UV záření může být navozena širokou škálou látek, které se dostávají do organismu cestou perorální, inhalací, parenterální aplikací injekčně nebo lokálním kontaktem s kůží (Ditrichová et al., 1999). Fotosenzibilizace je proces kdy látka zvaná fotosenzibilizátor dokáže absorbovat záření a na kůži vystavené slunečnímu záření zprostředkuje reakci. Mezi fotosenzibilizátory se řadí některá léčiva, sekundární metabolity rostlin, kosmetické přípravky a potravinová aditiva (např. barviva).

Po absorpci kvanta energie se molekula fotosenzibilizátoru excituje.

Navazující pochody lze formálně rozdělit na reakce jednak na kyslíku nezávislé a na pochody, které vyžadují přítomnost kyslíku.



Ad1) nezávislá na O₂: excitovaná molekula fotosenzibilizátoru přesunem elektronů nebo vodíku se může přímo vázat na nukleové kyseliny nebo bílkoviny případně nenasycené mastné kyseliny. Tím pozměňuje biologické vlastnosti příslušných struktur buňky

Ad2) závislé na O₂: excitovaná molekula fotosenzibilizátoru může část své energie přenést na molekulu kyslíku, který se tak stává singletovým kyslíkem, který je velmi reaktivní

Ad3) závislé na O₂: další možností – po přesunu elektronů mezi fotosenzibilizátorem a molekulou kyslíku za spolupůsobení záření, vzniká superoxidový radikál, který

vstupuje do Fentonovy reakce, jejímž výsledkem je pro buňky velmi toxický hydroxylový radikál (Ditrichová et al., 1999; Dubakiene` et al., 2006; Malina, 1999)

Kombinace fotosenzibilizátorů a UV záření se v praxi využívá i k tzv. fotochemoterapii. Již staří egyptští a později perští a arabští lékaři využívali extraktu z rostliny morače většího (čel. Apiaceae) k terapii některých kožních onemocnění.

Principem je opětovné vyvolávání kontrolované fototoxické kožní reakce (vzniklé následně po systémovém nebo lokálním podání fotosenzibilizantu 8-methoxypsoralenu), které vede postupně k hojení patologického tkáňového procesu. Tato tzv. PUVA-metoda má řadu indikací, z nichž nejvýznamnější jsou lupénka, palmoplantární pustulózy, kožní formy T-buněčného lymfomu, vitiligo a některé fotodermatózy (Malina, 1999; Csoma et al., 2006; Pathak et al., 1992).

Dříve se k testování fototoxinů běžně používala kůže dobrovolníků nebo pokusných zvířat. S rozvojem „welfare“ laboratorních a pokusných zvířat došlo k využívání matematického (kvantitativního) vyjádření vztahu chemických vlastností k biologickému účinku (QSAR = **Quantitative structure-activity relationship**). Odhad vlastností potenciálního fotosenzibilizátoru vychází z porovnání energetického rozdílu nejvýše položeného obsazeného orbitalu a nejnižší neobsazeného orbitalu (Veith et al., 1995; Ribeiro et al., 2005).

Na základě etických problémů s experimenty s laboratorními zvířaty, byly hledány zvláště v posledním desetiletí další screeningové metody testování.

Moderní přístup se obvykle sestává s následujícími kroky – viz. schéma:

a) zjištění absorpčního spektra potencionálního fotosenzibilizátoru v UV a VIS spektru záření

- z hlediska fotobiologického je nejvýznamnější **UVA 320-400nm** a část viditelného spektra, které mají sice dostatečnou energii k vybuzení molekuly fototoxinů ze základního do excitovaného stavu v závislosti na

chemické struktury příslušné molekuly, ale nevedou obvykle k její destrukci

- **UVB** část spektra **280-320nm** se vyznačuje vyšší energií a molekula fotosenzibilizátoru často podléhá dimerizacím až polymeracím, izomerizacím, přesmykům a jiným změnám
- **UVC** část spektra **180-280nm** vůbec na zemský povrch nedopadá

b) dalším důležitým krokem je studium různých fotochemických reakcí, kterým může podléhat molekula fotosenzibilizátoru. Je to jednak zjištění mechanismu fotodegradace, protože tyto produkty se mohou chovat jako hapteny a být příčinou vzniku alergických reakcí. Významná je i simulace chování v přítomnosti různých tzv. „biomolekul“.

Příkladem mohou být

1) vznik peroxidů nenasycených mastných kyselin a malonyldialdehydu (konjugované hydroperoxy nenasycených mastných kyselin se stanovují spektrometricky při 217 nm, malonyldialdehyd - jeden z produktů, který vzniká při oxidační degradaci nenasyc. mast. kyselin se stanovuje buď pomocí plynové chromatografie anebo převedením na charakteristický pigment s reakcí kyselinou thiobarbiturovou – zbarvení se měří spektrofotometricky – 532-535 nm)

2) stanovení 7-hydroxy derivátů cholesterolu, které se měří pomocí plynové chromatografie

3) stanovení produktů oxidační degradace aminokyseliny histidinu (vznikají působení superoxidového radikálu)

4) stanovení produktu fotoadice molekuly fotosenzibilizantu např. na thymin nebo na proteiny např. lidský albumin

c) výše uvedené testy se mohou kombinovat s metodami využívající kultury mikroorganismů, vyšších organismů + nebo buněk

Již v roce 1965 Daniels využíval kulturu kvasinek *Candida albicans* k *in vitro* testům pro zjištění efektu ozařování na povrch těchto organismů. Dále tento model sloužil pro testování efektů fotosenzibilizantů jako jsou např. furanokumariny, antracén. Deriváty tetracyklinu, deriváty chinolinů a chlorpromazinu sloužily pro testování fotosenzibilizujících vlastností k vývoji další metody *in vivo* lidských fibroblastů. Po ozařování byl zjišťován cytotoxický efekt inhibicí příjmu neutrální červeně v živých buňkách (Lasarow et al., 1992; Jones et al., 2003).

Podobného principu využívá i jeden z neznámějších a nejdéle používaných testů – *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test- test uznávaný zeměmi OECD (OECD 432), byl vyvinut a validován v rámci spojeného projektu EU/COLIPA v letech 1992 - 1997. Základem je buněčná linie myších fibroblastů (Balb/c 3T3, klon 31, sloužící ke zjišťování cytotoxicity [konkrétně s využitím MTT testu: MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) je mitochondriálními dehydrogenázami redukováno na barevný formazan. Rychlost tvorby formazanu odpovídá aktivitě dýchacího řetězce a odráží tak metabolickou aktivitu buňky]. Tato zkouška akutní fototoxicity velmi dobře koreluje s výsledky získanými na *in vivo* zvířecích a lidských modelech. Není vhodná pro zjištění efektů, které mohou plynout z kombinovaného působení chemické látky a světla jako např. fotogenotoxicity, fotoalergie a fotokarcinogenity, případně pro hodnocení kvalitativních ukazatelů jako je stupeň fototoxicity (OECD Guideline 432).

Další možný model *in vitro* testů využitelných v laboratorních podmínkách je test odvozený z keratinových buněk lidské epidermis. Jako endpointy slouží hodnocení jednak životaschopnosti buněk průtokovou cytometrií a imunofluorescencí (detekce γ -H2AX), imunodetekcí, dále fragmentace DNA (biomarkery účinku) pomocí elektroforézy, detekce apoptózy – metoda TUNEL assay (Toyooka et al., 2006; Aufiero et al., 2006).

Snaha co nejlépe extrapolovat získané výsledky z experimentu na lidskou kůži, vedla k rozvoji vícebuněčných modelů - 3D modelů rekonstruované kůže.

EpiDerm™ 3D model odvozený z epidermálních keratinocytů lidské kůže, které jsou dále kultivovány pro vznik *in vitro* modelu vícevrstevné epidermis analogické lidské epidermis *in-vivo*. Navíc je tato kůže metabolicky a mitoticky aktivní. Tento test (THE EPIDERM RECONSTRUCTED HUMAN EPIDERMAL (RHE) MODEL) byl validován Evropským centrem pro validaci alternativních metod pod č. 528 (ECVAM). Uvedený test byl vyvinut společností MatTek Corporation, USA (www.mattek.com) a test byl s úspěchem využit v řadě studií.

V současné době probíhá připomínkové řízení k guideline OECD pro hodnocení fototoxicity. Jedná se o EpiSkin model vyvinut společností L'Oréal, Francie (www.loreal.com). Základní surovinou pro výrobu Episkinu jsou kousky kůže odebrané při plastických operacích. Izolované kožní buňky jsou nanášeny na membránu z bílkoviny (kolagen) a pěstovány několik dní v živném roztoku až do vytvoření mohutného souvrství. Následně je svrchní vrstvička „vystrčena“ z živného roztoku a vystavena na 10 dnů působení vzduchu. Během této doby dojde k přeměně křehkých buněk na zrohovatělou vrstvu podobnou skutečné lidské pokožce (Lelièvre et al., 2007a; Lelièvre et al., 2007b).

Výše uvedené testy jsou odvozeny z lidské tkáně. Pro testování fototoxicity, se ale i využívají nižší organismy jako tzv. alternativní modely laboratorním zvířatům. Výsledky těchto testů slouží zejména jako screeningové metody nebo jako „comet assay“ pro zjištění fotosenzibilizujících vlastností sloučenin syntetického či přírodního původu. Při vhodně zvolených modelech (reprezentativních organismech) se tato hodnocení mohou stát i součástí odhadu rizika výskytu těchto látek pro životní prostředí.

Proto zvláště v poslední době se jeví jako velmi perspektivní metody, které se zaměřují na bezobratlé živočichy, jako jsou např. koryši rodu *Daphnia* a *Artemia* (Vytačilová et al., 2004) prvoci *Tetrahymena pyriformis*, máloštětinatce rodu *Tubifex* aj. Ty už byly v rámci studia fototoxicity využity ve výzkumu nitro-derivátů aromatických uhlovodíků případně k objasnění vztahu mezi mírou kancerogenity a fotodynamické aktivity některých polyaromatických uhlovodíků (Misra et al., 1999;

Morgan et al., 1977; Ojala et al., 1999; Misra et al., 2002). Hodnocení je zaměřeno jednak na mortalitu, poškození, ale i na biochemické markery expozice a účinku.

+ viz. **PŘÍLOHA 1** (publikace: Chobot V., Vytlačilová J., Jahodář L. (2004): Phototoxic activity and the possibilities of its testing, *Cent Eur J Publ Health, Suppl*, **12**, S31 - S33)

4.2. Charakteristika modelového organismu nítěnky větší - *Tubifex tubifex* Müller, 1774

Říše: ANIMALIA (ŽIVOČICHOVÉ)

Kmen: ANNELIDA (KROUŽKOVCI)

Třída: Clitellata (opaskovci)

Podtřída: Oligochaeta (máloštětinatci)

Řád: Plesiopora (nítěnkovci)

Čeleď: Tubificidae (nítěnkovití)

Rod: *Tubifex* (nítěnka)

(Sedlák, 2003)

4.2.1 Ekologie a rozšíření

Tubifex tubifex - nítěnka větší je sladkovodní máloštětinatý bentický kroužkovec, který se živí pohlcováním mikroorganismů na dně stojatých nebo tekoucích vod (Hrabě, 1981). Přičemž nevybírají jen potravní částice, ale přijímají veškerý materiál uložený na dně. U rodu *Tubifex* projde zaživací trubicí za 24 hodin množství bahna převyšující 4 – 6 násobně váhu těla. Nestravitelné zbytky jsou po té vyvrhovány análním otvorem ven (Lellák et al., 1982). Na základě laboratorních experimentů dospěli M. N. Lazim a M. A. Learner k závěru, že nítěnka vyhledává a

preferuje místa s vyšším výskytem hrabanky ve vodním toku, protože je zde kumulace bakterií v toku právě největší. V případě, že se tento rostlinný materiál vysterilizoval, poklesl zájem na minimum. Zároveň si ověřili, že nítěnky upřednostňují listový materiál v kombinaci s anorganickými částicemi tvořenými bahnem-jílem než v kombinaci s většími částicemi (písek) (Lazim et al., 1987). K obdobným závěrům, na základě pokusů v laboratoři, dospěl i tým Rodrigueze, který opět hodnotil preference potravy. Nítěnka vykazovala dvě úrovně selektivity ve vztahu k potravě – jednak preferovala drobné anorganické částice jílovitého charakteru a zároveň tato složka musela být obohacena o organický materiál (Rodriguez et al., 2001)

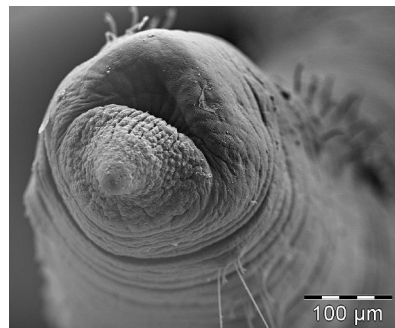
Svým výskytem se jedná o kosmopolitní druh. Najdeme ho jak v nejčistších vodách, tak i ve vodách velmi znečištěných, kde ustupuje druhu *Limnodrillus hoffmeisteri* (Hrabě, 1981; Prenda et al., 1992). Dokonce je označován, že jako poslední opouští velmi kontaminované prostředí (Bouché et al., 1999b). Jako indikátor znečištění vody lze použít v případě, kdy přihlídneme k jeho množství nikoliv k pouhé přítomnosti (Hrabě, 1981).

Nítěnky žijící v bahně obývají většinou vrstvu do 6 cm hloubky, ale mohou se vyskytovat ještě v hloubce 30 cm (Rulík et al., 1996). Ojedinele jsou nalézány i v hlubších horizontech hyporheálu (v hloubkách cca 40 cm), zde jejich množství ale prudce klesá (Lellák et al., 1982; Rulík et al., 1996). U nítěnek můžeme navíc pozorovat vertikální, horizontální i temporální distribuci. Nejmasovější výskyt v říčním sedimentu byl zjištěn v letních a zimních měsících. Lazim a kolektiv tuto teorii potvrzují a navíc uvádějí, že v jarních měsících převažují v populaci nítěnek drobní mladí jedinci, kdežto na podzim a v zimě dominují dospělci. Při vertikální distribuci bylo zjištěno, že největší abundance dospělců i kokonů je pozorována v sedimentech v blízkosti břehů ve srovnání s výskytem ve středu toku. Zároveň bylo potvrzeno, že velikostně menší jedinci preferují podpovrchové oblasti sedimentu, se vzrůstající délkou se prohlubuje hloubka výskytu (Lazim et al., 1989). Pozitivní korelace rozšíření nítěnek byla také nalezena ve vztahu k jejich predátorovi (*Erpobdella octoculata* – hltanovka bahenní) (Rulík et al., 1996).

4.2.2. Vnější anatomie

Tělo je dlouhé 20 – 85 mm, růžové, bez příčných žlutých proužků na zadních segmentech. Skládá se až ze 130 segmentů, které jsou rovnocenné (Hrabě, 1981). Na tělních člancích jsou obvykle nepočtené štětiny ve čtyřech svazečcích - ve hřbetních svazcích se nachází 2 – 5 vejřovitých a vlasovitých štětin, v břišních svazcích 3 – 5 rozeklaných štětin. Za opaskem směrem k análnímu konci dochází ke snižování celkového počtu štětin.

První článek tvoří hmatový prstík tzv. prostomium a peristomium, kde jsou umístěna ústa. Opasek se nachází na XI. – XII. segmentu (Hrabě, 1981; Brinkhurst et al., 1971).



Obr.1: *Tubifex tubifex* – Prostomium a peristomium s ústním otvorem (foto autorka)

Povrch těla je kryt průsvitnou, porézní a velmi tenkou (tloušťky 3 μ) kutikulou, pod ní se nachází jednovrstevná pokožka - epidermis. Epidermis je tvořena dvěma hlavními typy buněk – podpůrné buňky a méně diferencované kvádrové buňky cylindrického epitelu. Tloušťka je 40 – 45 μ na celém těle, kromě oblasti opasku, kde je tenká pouze 6 – 8 μ (Brinkhurst et al., 1971). Pokožka sehrává zároveň důležitou roli při absorpci kyslíku. U organismu je známo povrchové dýchání. Podle pokusů Alsterberga vydrží *Tubifex tubifex* 25 dnů ve vodě bez kyslíku. Zjistil, že schopnost anoxybiosy je do značné míry závislá na teplotě. Při teplotách 2 – 3 °C přežilo 30 % pokusných jedinců anoxii po 48 dnů, zatímco při teplotě 18 – 20 °C byla již 9. den všechna pokusná zvířata mrtvá. Jako zdroj energie je při anoxybiose ve zvýšené míře využíván glykogen. Za těchto podmínek se může podíl glykolýzy na metabolismu zvětšit 3 – 4 x. Velký podíl na schopnosti nitěnky přežít i

v nízkých koncentracích kyslíku ve vodě má také hemoglobin rozpuštěný v hemolymfě. Jeho množství je nepřímo úměrné množství kyslíku ve vodě. V prostředích s velkým množstvím zahnívajících látek na dně, kde nízké nasycení vody kyslíkem jsou jedinci intenzivně červeně zbarveni, kdežto ve vodách s dostatkem kyslíku jsou pouze světle červení. Při vyšší nasycenosti kyslíkem kolem cca 100 % při dané teplotě, byly nítěnky zavrtány v bahně a vyčnívalo několik posledních článků, které se nepohybovaly (stav apnoe). Při postupném poklesu nasycení kyslíkem nítěnky vysunovaly stále větší část těla a zrychlovaly rytmické pohyby koncové části těla (eupnoe a dispnoe). Při poklesu kyslíku k nulovým hodnotám zalezla pokusná zvířata opět do bahna a nepohybovala se (asphyxie). Alsterberg se domnívá, že zmíněný pohyb hraje významnou úlohu při výměně plynů a při přivádění k tělu vody bohatší na kyslík (Lellák et al., 1982).

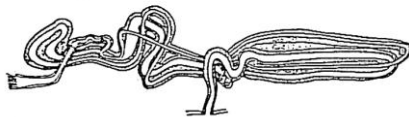
Pod pokožkou je rozsáhlý svalový vak, který je tvořen dvěma vrstvami podélných svalů, jež umožňují pohyb jedince (Brinkhurst et al., 1971).

4.2.3. Trávicí a vylučovací soustava

začíná na břišní straně prvního článku (prostomium) ústním otvorem, který pokračuje do hltanu. Dále navazuje jícen, žaludek a střevo. Vyústění tvoří řitní otvor na pygidiu. Z peritonea obklopující střevo se diferencuje zvláštní choragogenní tkáň, jejíž buňky mají depoziční a exkreční funkci. Dochází v nich například k ukládání glykogenu a tuků, jimi naplněné buňky po odtržení z tkáně aktivně transportují tyto látky po těle (jejich kumulace byla zjištěna v místech poranění nebo regenerace). Funkčně jsou přirovnávány k játrům obratlovců. (Sedlák, 2003; (Brinkhurst et al., 1971). V chloragogenních buňkách je syntetizován krevní hemoglobin, jsou zachycovány a neutralizovány toxiny, katabolicky se rozkládají proteiny a kumulují amonné látky. Žlutozelené zbarvení chloragogenních buněk je způsobeno akumulovaným heteroxanthinem, vzniklým z kyseliny močové. Způsob eliminace těchto odpadních látek není dostatečně známý, pravděpodobně se na něm podílejí vylučovací orgány – metanefridia (Sedlák, 2003).

Vylučovacími a osmoregulačními orgány jsou metanefridia. Většina metanefridií je párových a vyskytují se v každém segmentu kromě genitálních

segmentů a chybí také od šestého do osmého segmentu. Mohou velmi často chybět nebo mohou být méně vyvinuty na jedné straně těla (Brinkhurst et al., 1971). Vylučovací orgány z těla odvádějí přebytečnou vodu se zplodinami a ve vývodných kličkách jsou v místě opředeném cévami některé látky zpět vstřebávány do hemolymfy. Metanefridii jsou pravděpodobně také odstraňovány pevné odpadní látky z odumřelých chloragogenických buněk (Sedlák, 2003).



Obr. 2: Metanefridie nítěnky – se skládají z řasnaté nálevky (nephrostom), z krátkého kanálku, kterým prostupuje přepážka a smyčkově či spirálovitě stočeného kanálku, který vystupuje na povrch malým otvorem (Brinkhurst et al., 1971).

4.2.4. Cévní soustava

Cévní soustava je uzavřená. Základem je pulsující hřbetní a břišní céva, spojené obloukovitými spojkami. Hemolymfa je červeně zbarvená díky rozpuštěnému hemoglobinu. Velmi bohatá síť kapilár se nachází v pokožce, kde dochází k významné difúzi plynů (Brinkhurst et al., 1971; Sedlák, 2003) .



Obr. 3: Cévní systém *Tubifex tubifex* v trupové části - přední céva; si – supra-intestinal vessel (céva nad tenkým střevem) (Brinkhurst et al., 1971).

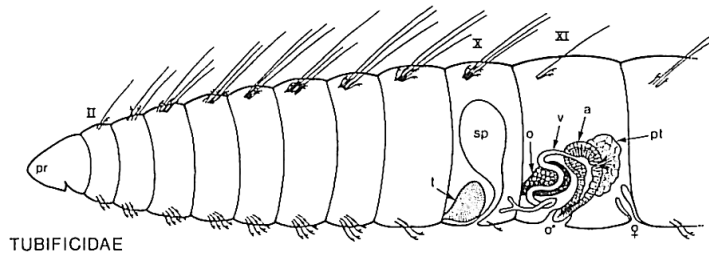
4.2.5. Nervová soustava a smyslové orgány

Nervová soustava žebříčkovitá. Nemá oči.

4.2.6. Rozmnožování a vývoj

Nítěnky jsou hermafroditi. Obvyklé rozmnožování je pohlavní. Gonády a jejich vývody jsou umístěné v přední části těla před opaskem. Samičí jsou tvořené párovitým ovariem s párem zásobních váčků na zralá vajíčka a párem pohlavních vývodů (jedná se o pozmeněná metanefridia). Samčí orgány tvoří pár varlat, pár semenných váčků (*vesiculae seminales*) na shromažďování a dozrávání spermií a opět nálevkovité pohlavní vývody. Vše je doplněno párem chámových váčků (*receptacula seminis*, spermatéky) pro uchování spermií druhého jedince. Chámové schránky často chybějí (Hrabě, 1981; Brinkhurst et al., 1971). Vajíčka a spermie získané z druhého jedince se hromadí v posunujícím se hlenovém pouzdře vzniklém uvolněním z opaskových žláz, ze kterého po svlečení vzniká kokon. Kokon je volně odkládán na dno. Konečný tvar dostává kokon až po uvolnění a tento tvar je charakteristický pro jednotlivé druhy máloštětinatců. U druhu *Tubifex* jsou kokony jednoduché, s průhledným obalem, oválného tvaru asi 1 až 2mm široké a 2 až 3mm dlouhé. Počet vajíček v kokonu je různý (1 – 40), vývoj embryí probíhá přímo a nestejně dlouhou dobu, u čeledi *Tubificidae* přibližně 20 dnů (Lellák et al., 1982).

Velmi obtížné je odhadnout délku života, protože téměř neexistují rozdíly, které by byly charakteristické pro jedince určitého stáří. Přesto se někteří autoři pokusili odhadnout maximální délku života, která je závislá na řadě vnějších faktorů (teplota, dostatek potravy, predátoři,...) a pohybuje se cca 11 let. V laboratorních podmínkách se tato doba zkracuje zhruba na polovinu – zde hraje významnou roli celoroční stabilní teplota, která dobu přežití výrazně ovlivňuje (Timm, 1984). Navíc po kopulaci dochází k resorpci pohlavního aparátu a původně dospělý jedinec se stává juvenilním (Lellák et al., 1982; Brinkhurst et al., 1971).



Obr. 4: Schéma přední části těla organismů čel. Tubificidae;

pr – prostomium, t- testis (varlata), sp – spermatheca (chámové váčky), o – ovary (ovarium), v – vas deferens (chámovod), a – atrium, pt – prostate (prostata) (Thorp et al., 2001).

Můžeme se také setkat s nepohlavním - architomickým rozmnožováním. V tomto případě dochází k regeneraci chybějících částí těla až po úplném oddělení dceřiných jedinců.

Publikovaná studie Baldy a Ferragutiho z roku 2005 byla zaměřena na vyjasnění „reprodukční strategie nítěnek“ pomocí analýzy markerů - alelických izoenzymů – Pgi (fosfoglukoisomerázy), Pgm (fosfoglukomutázy), Idh (isocitrátdehydrogenázy) elektroforézou, doprovázené studiem produkce a hodnocení spermií. Laboratorní experimenty objasňovaly jednak typ nepohlavního rozmnožování (partenogenetické či samooplodnění), dále reverzibilitnost partenogenetického rozmnožování - nutná nebo podmíněná a předpoklady vzniku pohlavního rozmnožování u laboratorních kultur. Rodičovské potomstvo bylo získáno z přirozené lokality řeky Lambro v severní Itálii v období jara a podzimu. Do experimentu vstupovali jedinci vylíhnutí z kokonů, rozdělených do několika studovaných skupin o rozdílné početnosti a stáří. Na základě dosažených výsledků bylo odvozeno, že střídání pohlavního a nepohlavního rozmnožování dává smíšené potomstvo. Nepohlavní rozmnožování je partenogenetické s cyklickým průběhem. V přirozených podmínkách se vyskytuje v případech nepříznivých abiotických a biotických podmínek. Při dosažení například vhodné teploty či hustoty populace je ale upřednostněno pohlavní rozmnožování. V experimentálních laboratorních podmínkách se nezdařilo pohlavní rozmnožování (Baldo et al., 2005).

4.3. Využití nítěnky jako modelu biologické aktivity

4.3.1. Proces dekontaminace, bioakumulace a eliminace těžkých kovů u nítěnky

Tubifex tubifex je znám jako velmi odolný druh ke znečištění vody těžkými kovy, zejména mědí a olovem, avšak mechanismy této adaptace nejsou přesně známy.

Byla provedena studie, kdy po expozici nítěnky subletální koncentrací mědí a olova došlo k abnormalitě zadní části těla. Morfologie přední části těla těchto nítěnek byla podobná jako u kontrolní skupiny. Nebyla zde žádná morfologická změna břišních ani hřbetních štětín, prostomium bylo neporušené. Avšak asi 75% těchto nítěnek mělo abnormální kaudální část. Polovina nítěnek zadní část úplně postrádala nebo ji obnovovala ze zbytku.

Ztráta ocasní části zahrnovala několik kroků. Nítěnka nejdříve odškrtila a izolovala zadní část od zbytku těla. Oddělená část pak zdegenerovala, zkroutila se a každý jednotlivý článek se zformoval do kuličky. Ve druhém kroku byla ztracena koncová část. Ve třetím kroku se rána uzavřela a zhojila. Ve čtvrtém stupni se regenerovala nová abdominální oblast. Toto ukazuje, že *Tubifex tubifex* se tímto způsobem chrání před zvyšující se koncentrací těžkých kovů oddělením zadní části těla, kde jsou tyto kovy naakumulovány (Lucan-Bouché et al., 1999b). Stejní autoři provedli obdobnou studii zaměřenou na kadmium. Opět hodnotili autonomii pomocí skenovacího mikroskopu jako subletální toxicitu kadmia. Celkový test probíhal 96 hodin a v průběhu experimentu bylo každých 24 hodin, hodnoceno množství živých nítěnek v závislosti na koncentraci látky. Nejdéle přežívali v nejnižších koncentracích. Experiment doplnili hodnocením schopnosti bioakumulace. Zjistili, že pokud byla nítěnka vystavena nejvyšší testované koncentraci ($0,01 \text{ mg.l}^{-1}$) došlo zároveň k největší bioakumulaci – biokoncentrační faktor 18,430. Při poloviční koncentraci ($0,05 \text{ mg.l}^{-1}$) se biokoncentrační faktor snížil na 15,040 (Lucan-Bouché et al., 1999a).

Německý tým Philippa Egelera se zaměřil na studium bioakumulace lipofilních látek (hexachlorcyclohexan, hexachlorobenzen a dichloroanilin) při

předpokladu, že se váží na vodní sedimenty. Nítky zde sloužily jako model bioakumulace a bioeliminace těchto cizorodých látek. Experiment probíhal s umělým sedimentem, kam byly uměle přidány radioaktivně značené lipofilní látky. Byl vypočten bioakumulační faktor z poměru hodnot koncentrací látek v nítkách ke koncentracím látek v sedimentu. Po té se nítky přemístili do čistého sedimentu a hodnotila se doba eliminace (hexachlorcyclohexanu a hexachlorobenzenu). Obě dvě sloučeniny byly eliminovány srovnatelně rychle a kompletně. Zároveň nebyl detekován žádný z hlavních metabolitů. Tyto získané závěry jsou v rozporu s hodnoceními na rybách, proto se do budoucna poskytnuté informace nítkami nemohou extrapolovat na ryby či jiné vodní organismy při hodnocení nebezpečnosti látek v životním prostředí (Egeler et al., 1999). S obdobnými závěry se můžeme setkat v práci afrických badatelů, kteří pro hodnocení bioakumulace těžkých kovů (olovo, kadmium, mangan, měď a zinek) odebírali vzorky kalu a nítek přímo z čistírny odpadních vod města Blantyre. Při srovnání hodnot naměřených v kalu s hodnotami zjištěnými v tělech nítek, které byly několika násobně nižší, dospěli k názoru, že kromě kadmia byly prokázány významné rozdíly mezi koncentrací v kalu a přímo v nítkách. U kadmia byly naměřeny obě koncentrace srovnatelné. Tímto autoři prokázali, že nítky mají nízkou schopnost bioakumulace v reálném prostředí a zároveň mají velkou schopnost bioeliminace (Kaonga et al., 2010).

K podobným závěrům dospěli ve studii Patricia L. Gills a kol., kteří příjem a vylučování hodnotili na základě koncentrace metallothioneinu, nízkomolekulárního proteinu, který se účastní detoxikace kovů. Cd, Pb a Ni ve formě dusičnanů, byly vystaveny nítky v experimentálních podmínkách po dobu 6 týdnů. Po expozici byly přeneseny do čistého akvária, kde se sledovala schopnost uvolňovat uvedené kovy. Příjem kadmia byl nejrychlejší v průběhu 24 hodin a jeho maximální koncentrace byla dosažena po 96 hodinách a dále po 4 týdnech. Naopak nejrychleji se vylučoval Ni, který se prvotně hromadí ve střevním obsahu a tím je umožněno rychlejší uvolnění. Kadmium i olovo se hromadí v tkáni a odtud je vylučování pomalejší (Gillis et al., 2004). Pozitivní korelace na výskyt těžkých kovů a metallothioneinu byla uvedena v řadě dalších publikací – Mosleh et al., 2006; Gillis

et al., 2002. Na toxicitu těžkých kovů má i vliv pH. V souboru deseti kovů (Cu, Cd, Co, Cr, Hg, Pb, Ni, Fe, Mn, Zn) byl sledován vliv pH (6, 7, 8). Nítky přežily lépe při pH 7. U Zn, Cu, Cd a Pb se prokázala signifikantní závislost na pH 6, která měla vliv na zvýšenou mortalitu (Khangarot et al., 2003). Zároveň i teplota ovlivňuje citlivost nitek na působení kovů. Ve stejném souboru kovů bylo zjištěno, že akutní toxicita Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Fe, Ni, Zn se zvyšuje se vzrůstající teplotou. Toxicita Mn není ovlivněna teplotou a u Fe má jen nepatrný vliv (Rathore et al., 2002).

4.3.2. Interakce nitek s UV zářením

Soni a Joshi (1997) ve své studii ozařovali *Tubifex tubifex* UVA, UVB, UVC a přímým slunečním světlem aby demonstrovali změny v chování. Ve své zprávě referují o následcích ozáření *Tubifex tubifex* UV světlem.

Kontrolní set organismů byl ponechán v laboratoři v neozářené destilované vodě nebo ve znečištěné vodě z řeky – po 24 hodinách byla mortalita pod 5%. Organismy vystavené UVA záření o intenzitě 2,5 J a 10 J přežily až do 20 hodin ozařování, ale po 480 hodinách následného stání jich zahynulo 12 – 17 %.

Tubifex tubifex velmi citlivě reagoval na UVC záření. Po ozáření UVC o intenzitě 50mJ byla pozorována okamžitá úmrtnost organismů. Organismy projevovali velmi rozdílné stupně mortality po expozici UVB zářením. Pěti až desetihodinové ozáření nízkou dávkou UVB záření o intenzitě 100 mJ přežilo 100% organismů a při pozorování dalších 48 hodin byl stupeň mortality poměrně nízký. Organismy vystavené dvou až desetihodinovému ozáření UVB o intenzitě 250 – 500 mJ sice kompletně přežily ozáření, ale následně umíraly mnohem rychleji než při pokusu s intenzitou 100 mJ.

Ze studie vyplynulo, že vystavení nízkoenergetickému dlouhovlnnému UVA záření *Tubifex tubifex* nepoškozuje. Nejvíce toxické se projevvalo vysokoenergetické krátkovlnné UVC záření, což ale v praxi není tak podstatné neboť toto záření je atmosférou odfiltrováno a k zemskému povrchu se nedostane.

Nejzávažnější zjištění bylo zaznamenáno při použití UVB záření, kde i malý vzrůst dávky měl za následek výrazné zvýšení mortality buněk (Soni et al., 1997).

V roce 2001 navázal na předcházející studii opět tým indických autorů. Zaměřil se na negativní vliv UVB záření ($0,35 \pm 0,5$ J). Vycházel z předpokladu, že UVB záření indukuje mortalitu nítěnek a podílí se na produkci reaktivních forem kyslíku (superoxidu, peroxidu vodíku, hydroxylového radikálu) nítěnkami. Mortalita nítěnek začala již v průběhu 3 h ozáření. V důsledku oxidačního stresu došlo k poklesu hladiny glutathionu, což vede k odumření buněk a poškození tkáně; může vést i ke vzniku nádorů. Prokázána byla i snížená koncentrace glutathion-S-transferázy. Signifikantně došlo ke zvýšení obsahu „reaktivních sloučenin kyseliny thiobarbiturové“ po expozici UVB, což naznačuje potenciál pro fotoperoxidaci lipidů membrány. Tyto procesy způsobují nevratné poškození buněk a vedou k zahájení patologických procesů (Misra et al., 2002).

4.3.3. Využití *Tubifex tubifex* ve srovnávacích studiích s metodami *in silico*

Metody *in silico* jsou založeny na odhadu výpočtem pomocí modelů vytvořených v počítačích. Mezi nimi jsou již dlouho využívány metody a modely analýzy QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship – kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou látek a velikostí jejich biologického účinku) a SAR (Structure Activity Relationship). Nítěnka *Tubifex tubifex* byla využita ve srovnávacích studiích pro testování toxicity jednoduchých alkoholů. Dosažené výsledky velmi dobře korelovaly s daty získanými na pokusech s obratlovcem a zároveň při srovnávací analýze QSAR. Publikované výsledky demonstrují možnost využití modelu zástavy pohybu nítěnky jako plnohodnotnou náhradu obratlovců, kteří se v testech toxicity často využívají (Tichý et al., 1996; Tichý et al., 2007; Tichý et al., 2008).

5. Experimentální část

5.1. Metodika testování fotosenzibilizátorů

Pilotní testování vycházelo z metodiky doc. RNDr. Miloně Tichého, CSc. ze Státního zdravotního ústavu v Praze a publikovaného jako: Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*, *Pracov. Lék.*, **48**, 1996, 225 – 230

Metodika zahrnuje:

1. přípravu modelového organismu
2. přípravu testovaných látek
3. vlastní testování
4. vyhodnocení výsledků
5. zhodnocení experimentu a statistické zpracování

5.1.1. Příprava modelového organismu *Tubifex tubifex*

Pokusné nítěnky byly zakoupeny v potřebách pro akvaristy. Neměly by být dlouho uskladněny. Lépe je získat nítěnky přímým odlovem z volné přírody. V současné době je jejich masivní výskyt pozorován v oblastech, kde není zcela dokonale vyřešeno čištění odpadních vod, které je spojeno s bakteriálním oživením. Transport do laboratoře byl proveden v chladičí tašce pro zajištění konstantní teploty. Prudká změna teploty (vysoká teplota v létě) jednak urychluje rozkladné procesy v populaci nítěnek a zároveň dochází k poškození celého povrchu těla.

Takto získané organismy po velmi důkladném několika násobném propláchnutí deionizovanou vodou byli umístěny do adaptačního akvária. Dno bylo pokryto do cca 1/3 jemným říčním pískem ve směsi s jílovitými částicemi. Dvakrát týdně byly krmeny vločkami TetraMin. Při dlouhodobější adaptaci byly cca 1 x za měsíc přidány sušené kvasnice.

V laboratorním akváriu byla konstantní teplota vody 20 ± 2 °C, světelný režim světlo : tma v poměru 10 : 14 , množství rozpuštěného kyslíku nejméně 8 mg.l⁻¹ a pH = $7,5 \pm 0,1$. Výměnu vody (deionisované vody) v akváriích byla prováděna 1 x za týden. V případě potřeby i častěji – tato situace nastala při získání nítěnek z oblastí silně znečištěných, zapáchajících nebo při vysoké (v létě) či nízké (v zimě) teplotě vzduchu a vody v průběhu roku.

V adaptačních podmínkách byly ponechány nítěnky optimálně 14 dnů, nejméně 1 týden.

24 hodin před vlastním zahájením experimentu byly nítěnky vyjmuty z akvária a přemístěny do Petriho misky s deionizovanou vodou, umístěny do termostatu (20 °C, bez přítomnosti světla) a nebyly krmeny. Jakákoliv manipulace probíhala pouze entomologickou pinzetou, aby nedošlo k poškození organismu.

5.1.2. Příprava testovaných látek

Bylo postupováno podle rozpustnosti látek. Z látek hydrofilních byla připravena koncentrační řada. Látky hydrofobní byly rozpouštěny v přidavku organického rozpouštědla (DMSO) do maximální koncentrace 1,5 obj.%. Rozpustnost hydrofobních látek v DMSO byla urychlena ultrazvukem. Veškerá manipulace s látkami probíhala bez přítomnosti přímého osvětlení, za šera.

5.1.3. Vlastní testování

Pomocí entomologické pinzety byly naplněny 24 jamkové destičky nítěnkami. Každá jamka byla naplněna 480 µl deionizované vody kam bylo přidáno po 6 jedincích. Nítěnky byly charakterizovány živou hmotností, která se pohybovala v rozmezí 14 – 20 mg. Po té byla destička zkontrolována pod stereo mikroskopem (se studeným světlem), aby nebyli do experimentu vybráni jedinci poškození, a následně byla destička umístěna do termostatu při teplotě 20 °C, kde byla připravena na přidání testovaných látek.

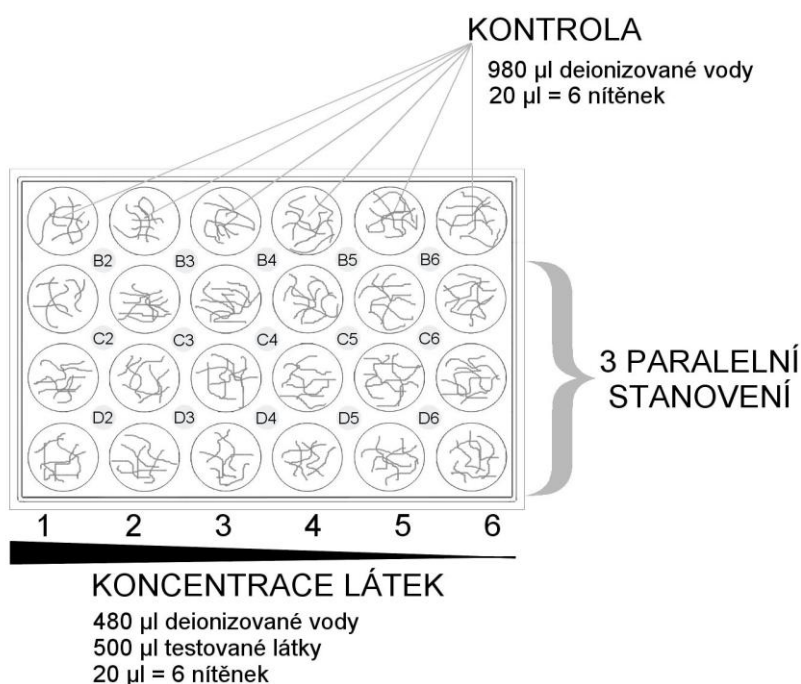
Před započítáním všech experimentů byl proveden test se standardní látkou MnCl₂ pro ověření vitality nítěnek. Po uplynutí standardní doby (1 h) byla odečtena mortalita LC₅₀ [68,04 mM (29,95 – 36,74 mM)]. Pro ověření citlivosti *Tubifex tubifex*

vůči UVA záření a fotosenzibilizantu byl proveden test s pozitivní kontrolou - bengálskou červení. Test probíhal 30 minut. Po 30 minutách byla vyhodnocena mortalita [ozářené – LC₅₀ 0,82 mM (0,75 – 0,89 mM); neozářené - LC₅₀ 4,69 mM (1,59 – 13,89 mM)]. Následně bylo přistoupeno k vlastnímu testování.

Naředěná sada testované látky byla přidána k nítěnkám v inkubátoru (20±2°C). 15 minut bez přítomnosti světla probíhalo sycení. Po 15 minutách byla destička vložena pod UV lampu – UVA záření (365 nm; hustota zářivého toku 350 μW/cm²).

Při vlastním testování látek bylo začínáno tzv. předběžnými testy, abychom mohli zjistit rozpětí koncentrací látek, na které nítěnka reaguje. Na základě vyhodnocených výsledků byl proveden vlastní test. Současně s testovanou látkou byla na destičkách i kontrola nítěnek (negativní kontrola) pouze v deionizované vodě bez přítomnosti testované látky. V rámci testování fotosenzibilizátorů byla naplněna destička testovanou látkou a kontrolou (deionizovaná voda) a po celou dobu experimentu umístěna ve tmě v inkubátoru (20±2°C). V tomto případě byl testován pouze vliv látky bez přítomnosti záření. Na závěr zvolené doby ozařování (30 min; 45 min; 60 min; 120 min; 240 min) bylo ihned provedeno vyhodnocení destiček pod stereomikroskopem. Každý experiment proběhl nejméně třikrát pro ověření správnosti.

Obr. 4: 24 jamková destička – dávkovací schéma



5.1.4. Vyhodnocení výsledků

Jako endpointy byla hodnocena:

- mortalita (nítěnky nejevily známky pohybu a nepulsovala hřbetní céva po dobu 10 minut ani po kontaktu s tupým koncem preparační jehly) – LC₅₀
- procento poškozených jedinců – hodnoceno zejména v přední části těla (oblast prostomia) a při pohledu na celou nítěnku – EC₅₀

5.1.5. Zhodnocení experimentu a statistické zpracování

Na základě výše uvedených zjištění statisticky byly vyhodnoceny - nelineární regresní analýzou (statistický software Prisma 5) hodnoty LC₅₀ pro mortalitu ozářené a neozářené jedince; EC₅₀ v případě hodnocení poškození.

Jestliže jsou v obou případech jak při ozáření (+UVA), tak bez ozáření (-UVA) získány úplné křivky závislosti odezvy na koncentraci, lze využít výpočet pro fotoiritační faktor (PIF) vypočítat z poměru hodnot EC₅₀ (koncentrace, která způsobí 50% mortalitu LC₅₀, případně poškození EC₅₀) bez UV ozáření a stejných hodnot získaných při ozáření podle vzorce:

tzv. PIF (fotoiritační faktor):

$$PIF = \frac{EC50 (-UV)}{EC50 (+UV)}$$

Definice říká, že testovaný materiál je potenciálně fototoxicky nebezpečný, je-li $PIF \geq 5$. Tento výpočet se využívá při hodnocení a zpracování výsledků *in vitro* testu: FOTOTOXICITY – ZKOUŠKY FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO* (Jones et al., 2003; Směrnice komise 2000/33/ES).

5.2. Testované látky

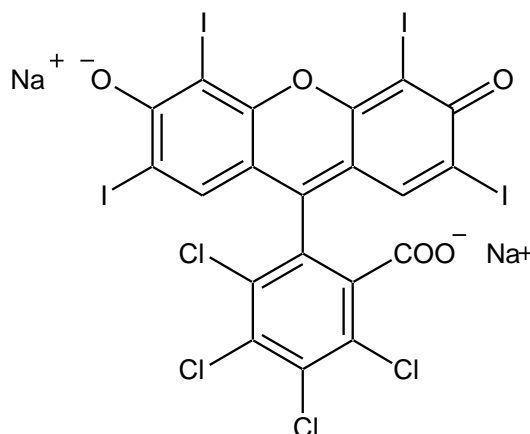
1. látky s prokázanou fotosenzibilizační aktivitou – **bengálská červeň**, **khellin**, **xantotoxin** - p.a., Sigma Aldrich

- izolované aktivní přírodní látky - **thiofenový polyyn, umbelliferon, skopolin, skopoletin** – čistota a pravost látek ověřena IČ spektroskopie, UV spektroskopie, NMR spektroskopie
- syntetické látky – **salicylanilidy (2), thiosalicylanilidy (1+5)** - čistota a pravost látek ověřena IČ spektroskopie, UV spektroskopie, NMR spektroskopie
- léčiva – standard antibiotika: **amoxicilin** - p.a. (Sigma Aldrich) a léčiva **Augmentin a Ospamox**

5.2.1. Látky s prokázanou fotosenzibilizační aktivitou – bengálská červeň, khellin, xantotoxin

5.2.1.1. Bengálská červeň

4,5,6,7-tetrachloro-3',6'-dihydroxy-2',4',5',7'-tetrajodospiro-[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanten]-3-on sodný

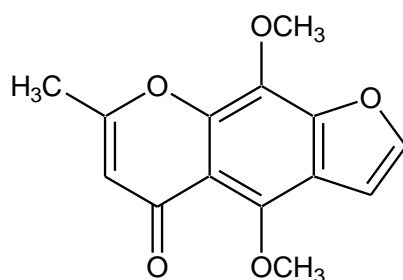


Bengálská červeň je xanthen charakterizovaný vysokým absorpčním koeficientem ve viditelné oblasti spektra a se sklonem k předávání elektronů v excitovaném stavu za vzniku radikálů s dlouhou životností. Díky svým fotochemickým a fotofyzikálním vlastnostem je bengálská červeň široce používána jako ideální reagens všude tam, kde se očekává vytváření singletového kyslíku nebo reaktivních radikálů (Fini et al., 2004), jako standard při studiích aktivity potenciálních fotosenzibilizantů (Mothilal, 2004; Rajendran et al., 2004). Jako zdroj singletového kyslíku ve studiích

fotchemické degradace látek, ve vývoji metod pro dekontaminaci odpadních vod (Miller, 2005) nebo při objasňování buněčných obranných mechanismů proti poškození singletovým kyslíkem (Kim et al., 2004).

5.2.1.2. Khellin

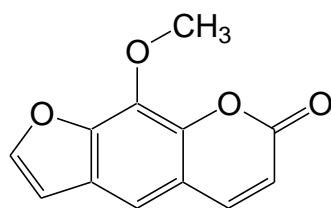
4,9-methoxy-7-methyl-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-on



Khellin je přirozeně vyskytující furochromon, původně popsán v semenech *Amni visnaga* L. Dostává se mu velké pozornosti – kromě chemických a toxikologických oblastí je také důkladně zkoumán kvůli svým farmakologickým vlastnostem (Píš et al., 1994; Budesínský et al., 2008). Fowlks a kolektiv byli první, kdo rozpoznali fotosenzibilizující vlastnosti khellinu pro gram-pozitivní bakterie (Trumble et al., 1991). Na fotochemické a fototerapeutické vlastnosti podobné furokumarinům se dá usuzovat již ze strukturální podobnosti. Při pokusech se skutečně ukázalo, že khellin je ve fotochemoterapii vitiliga přinejmenším stejně účinný jako psoralenové deriváty. Výhodou oproti bifunkčním psoralenům je nepřítomnost dlouhodobých vedlejších účinků a fototoxických erytérogenních účinků na kůži a dále nízká genotoxicita khellinu. Tyto důvody podněcují snahu o syntézu nových derivátů furanochromonů jako terapeuticky aktivnějších a méně toxických molekul. Chen a kol. se ve své studii zabývali schopností khellinu štěpit DNA i schopností tvořit „crosslink“ vazby a došli k závěru, že khellin je sice slabší fotosenzitizér než psoraleny, ale přesto je schopen štěpit DNA i tvořit „crosslink“ vazby a tato schopnost je závislá na dávce (Chen et al., 1993).

5.2.1.3. Xantotoxin

9-methoxy-furo[3,2-g]chromen-7-on

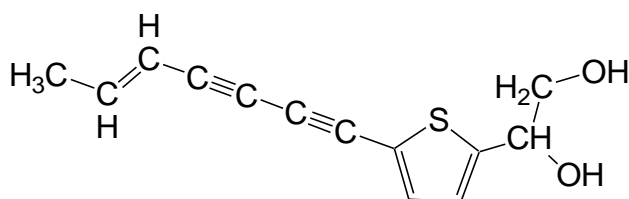


Jeden z nejběžnějších furokumarinů produkovaných rostlinami. Tyto látky jsou velmi užitečné nejen pro rostliny jako antifungální a antibakteriální činitelé, ale také v humánní medicíně. Tato skupina sekundárních metabolitů je úspěšně a efektivně užívána díky svým fotoreaktivním vlastnostem; tato tzv. PUVA-metoda má řadu indikací, z nichž nejvýznamnější jsou lupénka, kožní formy T-buněčného lymfomu, vitiligo a některé fotodermatózy. Fototerapie s psoraleny spočívá v terapeutické kombinaci psoralenových derivátů a dlouhovlnného UVA-záření, kdy uvedené sloučeniny vyvolávají zvýšenou citlivost vůči uvedenému pásmu solární radiace (Píš et al., 1994). Rostliny *Amni majus* L. (Apiaceae) \ *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) jsou považovány za nejbohatší zdroje přírodních kumarinů jako je umbeliferon a lineární furokumariny jako je psoralen, bergapten a právě xantotoxin. Furokumariny mají široký rozsah fotobiologických aktivit (Birkhäuser, 1962; Slovácová et al., 2009).

5.2.2. Izolované aktivní přírodní látky - thiofenový polyyn, umbeliferon, skopolin, skopoletin

5.2.2.1. Thiofenový polyyn

(E)-1-[5-(hept-5-en-1,3-diyynl)-2-thienyl]-ethan-1,2-diol



Polyyn získán z rostliny *Leuzea carthamoides* DC., parcha saflorová, čel. Asteraceae, (syn. *Rhaponticum carthamoides* (Willd) Iljin). Byl izolován na katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Hradec Králové (Chobot et al., 2003). Rostlina je zdrojem hned několika skupin biologicky aktivních látek, především ecdysteroidů (derivátů cholestanu) s hlavně adaptogenními účinky a hořce

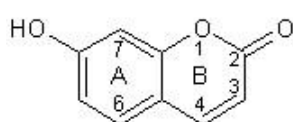
chutnajících guajanolidů (seskviterpenických laktonů) využitelných jako digestivum (Rajendran et al., 2004). Dalšími důležitými sloučeninami v rostlině jsou flavonoidy, stilben, polyacetyleny (polyyny) a N-feruloylserotoninové izomery (Rajendran et al., 2004; Miller, 2005). Vodné či alkoholové extrakty připravené z kořenů *Leuzea carthamoides* jsou používány jako stimulans, roborans a tonikum (Kim et al., 2004); je používán při nervovém vypětí v boji (combat stres), pro zlepšení psychické i fyzické kondice, pro anabolické, antioxidační a antikancerogenní účinky, pro prevenci infekčních onemocnění, neuróz apod. (Rajendran et al., 2004; Miller, 2005; Jahodář et al., 1999).

5.2.2.2. Umbelliferon, skopolin, skopoletin

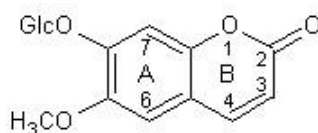
Testované látky byly získány z rostliny *Evolvulus alsinoides* L. (evolvulus kuřičkovitý), čel. Convolvulaceae. Izolací a identifikací látek se zabýval Mgr. František Červinka ve své disertační práci: Bioassay quided separace metabolitů vybraného rostlinného druhu – *Evolvulus alsinoides* na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Pro předpokládané fotosenzibilizační účinky byly vybrány zástupci kumarinů:

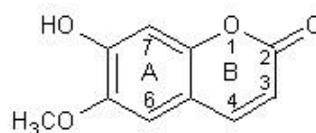
umbelliferon, skopoletin a skopolin.



Umbelliferon



Skopolin



Skopoletin

Jedná se o deriváty o-kumarové kyseliny vyskytující se buď ve volné formě, nebo glykosidicky vázané s cukry. K základní struktuře může být navíc přikondenzován furanový nebo pyranový cyklus. Jejich účinek je závislý na nenasyceném laktonovém kruhu. Nejčastěji jsou kumariny spojovány s antikoagulační aktivitou. Ta však není příliš významná, protože při průchodu GIT dochází k inaktivaci kumarinu a výsledný antikoagulační efekt je velmi slabý.

Kumarinům lze připisovat následující účinky: antiagregační, spasmolytické, antimikrobiální, fototoxické, hypnotické, antifungální, antiprotozoální, antioxidační, kardiotonické, venotonické, insekticidní, abortivní a antimutagenní. Ovlivňují také gastrointestinální trakt a tlumí CNS.

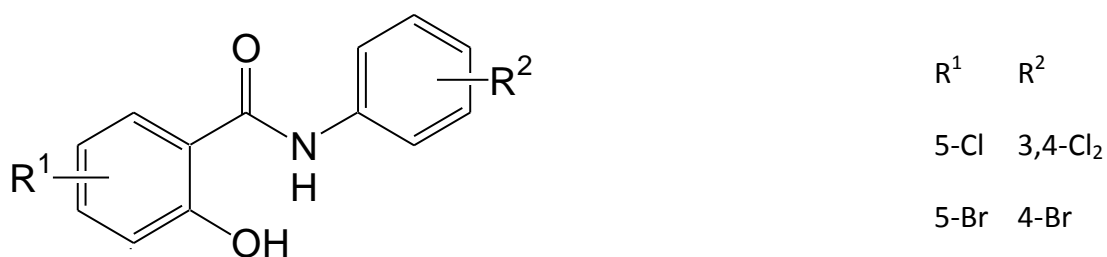
Mezi jejich nejvýznamnější toxické účinky lze zařadit fototoxicitu. Senzibilizují pokožku na sluneční záření a působí silné zarudnutí pokožky a alergické reakce (Tomko et al., 1999; <http://faf.vfu.cz>; Červenka, 2009).

5.2.3. Syntetické látky – salicylanilidy, thiosalicylanilidy

5.2.3.1. Salicylanilidy

3',4',5-trichlorsalicylanilid

4',5-dibromsalicylanilid

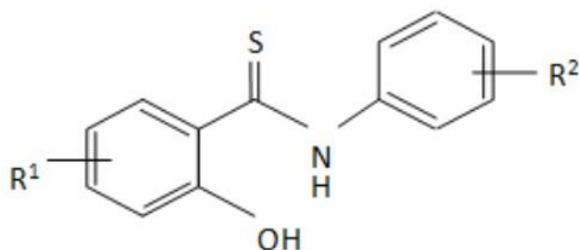


Substituované salicylanilidy použité pro testování fotosenzibilizace byly připraveny na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK reakcí substituované kyseliny salicylové s příslušným anilinem a chloridem fosforitým v chlorbenzenu. Salicylanilidy jsou významnou skupinou biologicky aktivních sloučenin. V závislosti na druhu, počtu a poloze substituentů mohou mít různé biologické účinky, např. antibakteriální, protituberkulózní, antimykotický, anthelmintický, moluskocidní, antiprotozoární, herbicidní, analgetický a protizánětlivý (Kubicová et al., 1992). Halogenované salicylanilidy vykazují dva typy účinků souvisejících s ozářením. Prvním z nich je fototoxický účinek, tj. zánětlivá reakce po ozáření. Ta je důsledkem chemického poškození tkání vlivem fotochemických procesů (poškození biologicky aktivních molekul reaktivními formami kyslíku), které jsou stimulovány fototoxickou látkou. Kromě toho působí halogenované salicylanilidy i jako fotoalergeny. Jedná se

o buňkami zprostředkovanou reakci pozdního typu, přičemž fotoalergen (salicylanilid) působí jako prohaptén. K fotoalergizujícímu působení dochází uvolněním jednoho či více halogenových radikálů po ozáření UV; volný radikál reaguje s proteiny za vzniku nové molekuly, která může působit jako antigen *in vivo*. (Harber et al., 1967). Dříve byly zejména halogenované salicylanilidy často používány pro své antimikrobiální účinky jako antiseptika a desinficiencia v medicíně, kosmetice i technických oborech. Na přelomu 50. a 60. let minulého století, se ale zjistilo, že halogenované salicylanilidy vyvolávají fotokontaktní dermatitidy, a proto byly až na výjimky postupně staženy z používání (Kubicová et al., 1992).

5.2.3.2. Thiosalicylanilidy

	R ₁	R ₂
thiosalicylanilid	H	H
3',4'-dichlorthiosalicylanilid	H	3,4-Cl ₂
4'-methylthiosalicylanilid	H	4-CH ₃
5-chlorthiosalicylanilid	5-Cl	H
3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid	3,5-Cl ₂	4-Cl
3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid	3,5-Cl ₂	4-Br



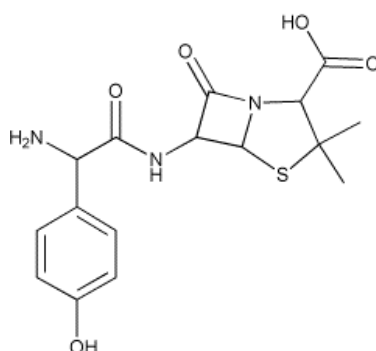
Thiosalicylanilidy jsou sirnou obdobou salicylanilidů, tzv. izostery (Waisser et al., 2001). Substituované thiosalicylanilidy použité pro testování fototoxicity byly připraveny na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK reakcí substituované

kyseliny thiosalicylové s příslušným anilinem a chloridem fosforitým v chlorbenzenu (Waisser et al., 2003).

5.2.4. Léčiva – standard antibiotika: amoxicilin - p.a. (Sigma Aldrich) a léčiva Augmentin a Ospamox

5.2.4.1. Amoxicilin

$C_{16}H_{19}N_3O_5S$



Peniciliny jsou rozdělovány do čtyř hlavních kategorií dle různého spektra aktivity. Přírodní peniciliny (penicilin G a penicilin V) jsou aktivní proti mnoha gram-pozitivním mikroorganismům, gram-negativním kokům a některým dalším gram-negativním organismům. Polosyntetické aminopeniciliny (ampicilin, **amoxicilin**, bakampicilin a pivampicilin) působí proti penicilin-senzitivním bakteriím stejně jako proti *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. a *Haemophilus influenzae*.

léčiva

5.2.4.2. Augmentin 625 mg - držitel rozhodnutí o registraci: Smithkline Beecham Pharmaceuticals, Brentford, Velká Británie

- ATC skupina: J01CR02; léková forma: Potahovaná tableta

- účinná látka: Amoxicillinum trihydricum 574 mg (což odpovídá 500 mg amoxicilinu) a Kalii clavulanas 149 mg (což odpovídá 125 mg kyseliny klavulanové) v jedné tabletě

- pomocné látky: magnesium-stearát, sodná sůl karboxymethylškrobu, koloidní oxid křemičitý, mikrokrystalická celulóza, oxid titaničitý, hypromelosa 2910/5, hypromelosa 2910/15, makrogol 4000, makrogol 6000, dimetikon

5.2.4.3. *Ospamox 375 mg/5 ml* - držitel rozhodnutí o registraci: Sandoz GMBH, Kundl, Rakousko

- ATC skupina: J01CA04, léková forma: zrněný prášek pro přípravu perorální suspenze

- účinná látka: Amoxicillinum trihydricum 430,5 mg (což odpovídá 375 mg amoxicilinu) v 5 ml (1 odměrce) suspenze

- pomocné látky: Benzoan sodný, dihydrát sodné soli sacharinu, simetikon, citronan sodný, galaktomanan guar, aroma mučenkové, malinové a jahodové
(Mikro-verze AISLP – ČR 2008.1 pro MS Windows).

6. Výsledky

6.1. Látky s prokázanou fotosenzibilizací – bengálská červeň, khellin, xantotoxin

6.1.1. Mikroskopické hodnocení

Design experimentu:

- Zpočátku bylo potřeba objasnit, zda nítěnka reaguje na předkládané látky a jakým způsobem dochází k poškození povrchu (SKEM), které bylo jenom lehce pozorovatelné pod stereomikroskopem při celkovém zvětšení 40x.
- Hodnocení bylo doplněno kvantifikací počtu poškozených jedinců a hodnotou mortality.

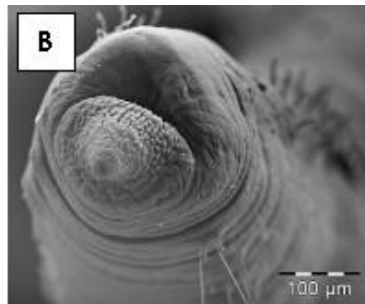
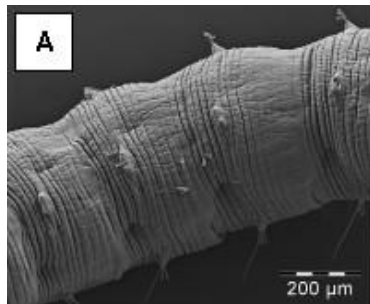
Vzorky pro elektronovu mikroskopii byly zpracovány ihned po vyhodnocení výsledků pod stereomikroskopem. Postup zpracování vzorku vycházel ze standardní metodiky Laboratoře elektronové mikroskopie (Laboratoř charakterizace molekulární struktury) Mikrobiologického ústavu Akademie věd Praha, která byla později publikována (Eichlerová I. et al., 2007): nítěnky byly fixovány v 3% glutaraldehydu v 0,1 M kakodylátovém pufru, pH 7,2 přes noc. Následující den byly intenzivně proprány v kakodylátovém pufru a odvodněny ve vzestupné alkoholové řadě (25, 50, 75, 90, 96 a 100%), posléze ve 100% acetonu a vysušeny při kritickém bodu (Balzers CPD 010). Na závěr byly vzorky pokoveny zlatem a pozorovány pod skenovacím mikroskopem Aquasem (Tescan, Brno). Vzorky byly zpracovány ve spolupráci s RNDr. Olgou Kofroňovou, CSc. a RNDr. Oldřichem Benadou, CSc.

Výsledky pozorování pod skenovacím mikroskopem viz. **PŘÍLOHA 2** (publikace: Vytlačilová J., Chobot V., Jahodář L., Laakso I., Vuorela P. (2004): Tubifex tubifex Müll. – photosensitive organism, *Cent Eur J Publ Health, Suppl*, **12**, S89–S93)

- v této publikaci jsou prezentovány výsledky bengálské červeně a chinidinu pozorovatelné pod skenovacím mikroskopem doplněny výpočtem EC₅₀ pro počet poškozených jedinců

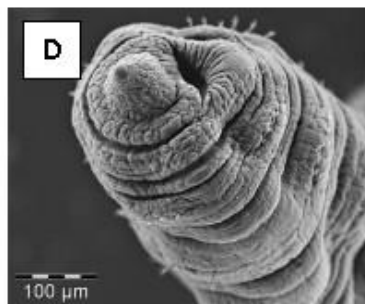
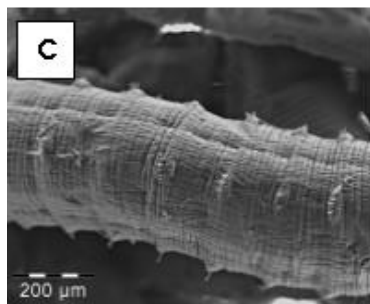
- nepublikované výsledky pro khellin ve srovnání s nítěnkou bez přítomnosti testované látky; vlastní experiment popsán dále

Obr.5: Poškození nítěnky vlivem khellinu při 30 min ozáření a bez ozáření (UVA), porovnání s kontrolou (ozářenou a neozářenou)



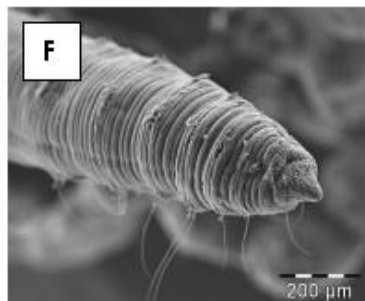
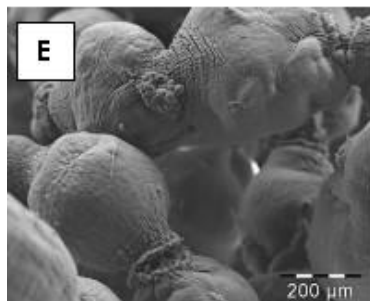
ACEG - střední část nítěnky

BDFH - prostomium, peritoneum



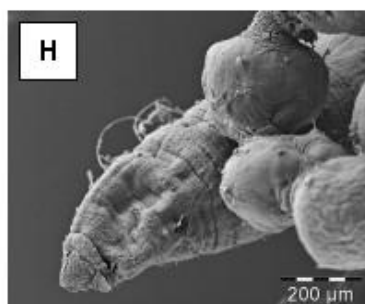
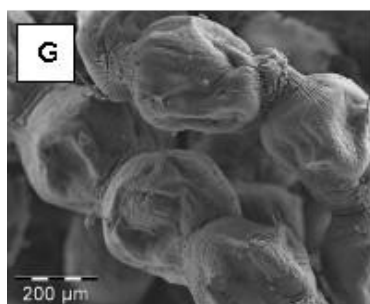
A,B- neozářovaná nítěnka (temnostní kontrola- deionizovaná voda)

CD- ozařovaná nítěnka (deionizovaná voda)



EF- khellin bez ozáření

GH- khellin 30 min. ozáření (UVA)



(foto autorka)

6.1.2. Toxikologické hodnocení

Komentář k dále prezentovaným výsledkům:

Prezentované tabulky s výsledky hodnocení jednotlivých látek jsou z důvodu přehlednosti sdruženy v jednu tabulku. Ta obsahuje průměrné hodnoty dosažené při třech paralelních stanovení se směrodatnou odchylkou pro jednotlivé testované koncentrace. Pro výpočet hodnot EC₅₀ a LC₅₀, nelineární regresní analýzou (software Prisma), sloužily primární data ze všech tří paralelních stanovení. Zvolené grafy vyjadřují vztah mezi testovanou koncentrací a odezvou organismu (mortalita, poškození) pod vlivem UVA nebo bez přítomnosti UVA záření.

6.1.2.1. Bengálská červeň

Testované koncentrace: 2,5 – 0,0012 mM

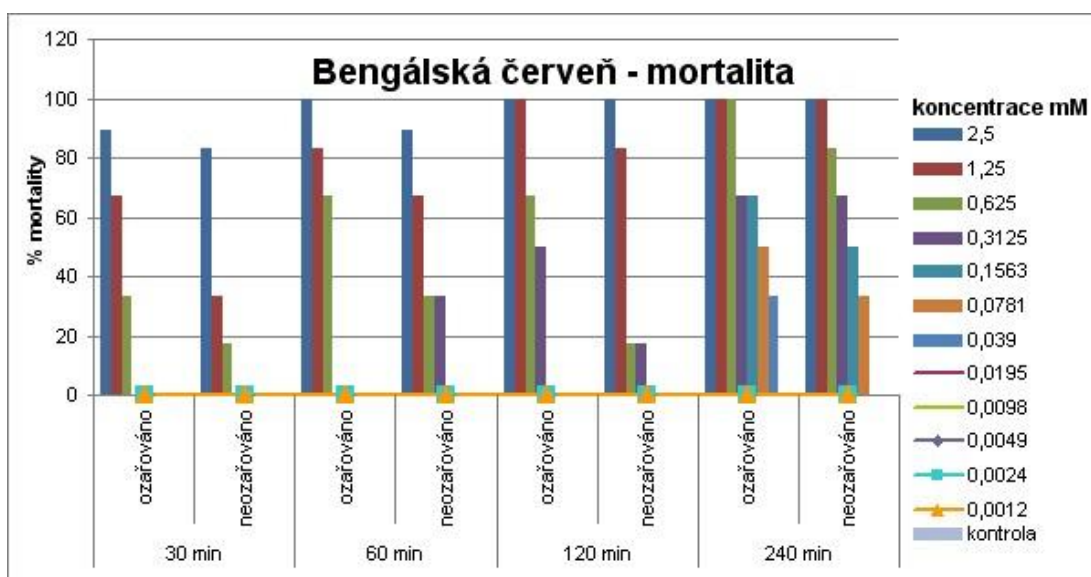
Doba působení látky v přítomnosti UVA a bez UVA: 30, 60, 120, 240 min

Vyhodnocovaný endpoint – mortalita, poškození

Tab. 1: Bengálská červeň - %±S.O. mortalita nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	30 min		60 min		120 min		240 min	
	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno
2,5	89±9,8	83±0	100±0	89±9,8	100±0	100±0	100±0	100±0
1,25	67±0	33±0	83±0	67±0	100±0	83±0	100±0	100±0
0,625	33±0	17±0	67±0	33±0	67±0	17±0	100±0	83±0
0,3125	0±0	0±0	0±0	33±0	50±0	17±0	67±0	67±0
0,1563	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	67±0	50±0
0,0781	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	50±0	33±0
0,039	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	33±0	0±0
0,0195	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0098	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 1: Grafické vyjádření mortality nítěnek



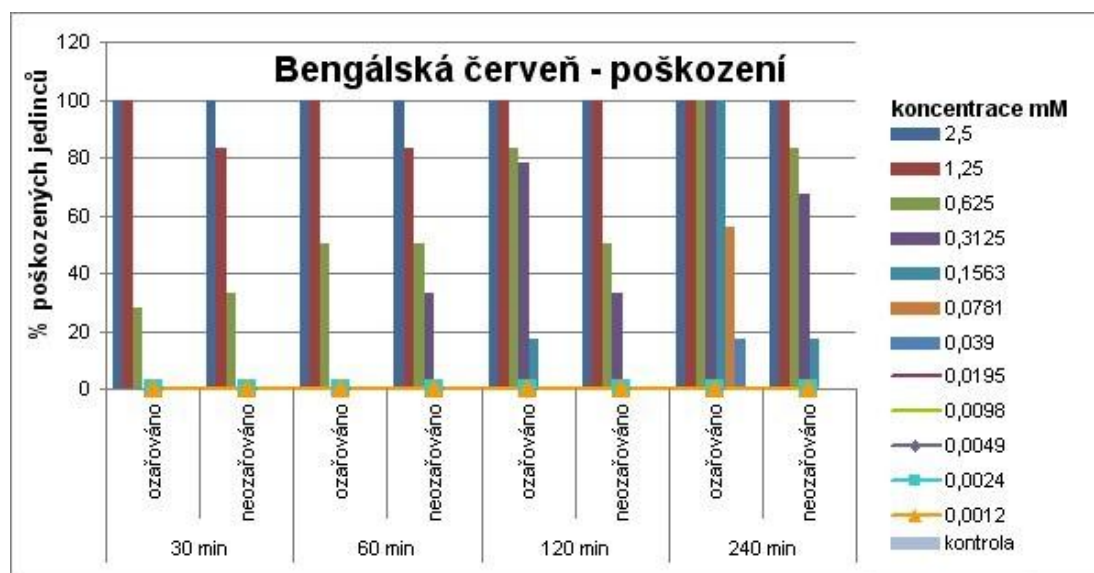
Tab. 2: Hodnoty LC₅₀ (mortalita) v mM a PIF faktoru

mM	LC ₅₀ po ozáření	LC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
bengálská červeň – 30 min	0,82 (0,75 – 0,89)	4,69 (1,59 – 13,89)	5,72
bengálská červeň – 60 min	0,55 (0,51 – 0,60)	1,03 (0,58 – 1,81)	1,87
bengálská červeň – 120 min	0,38 (0,34 – 0,43)	0,90 (0,83 – 0,97)	2,37
bengálská červeň – 240 min	0,08 (0,07 – 0,09)	0,17 (0,15 – 0,19)	2,13

Tab. 3: Bengálská červeň - %±S.O. poškozených nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	30 min		60 min		120 min		240 min	
	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno
2,5	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
1,25	100±0	83±0	100±0	83±0	100±0	100±0	100±0	100±0
0,625	28±9,2	33±0	50±0	50±0	83±0	50±0	100±0	83±0
0,3125	0±0	0±0	0±0	33±0	78±9,2	33±0	100±0	67±0
0,1563	0±0	0±0	0±0	0±0	17±0	0±0	100±0	17±0
0,0781	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	56±9,8	0±0
0,039	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	17±0	0±0
0,0195	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0098	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 2: Grafické vyjádření procenta poškozených nítěnek



Tab. 4: Hodnoty EC₅₀ (poškození) v mM a PIF faktoru

mM	EC ₅₀ po ozáření	EC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
bengálská červeň – 30 min	0,31 (0,22 – 0,46)	0,72 (0,50 – 1,03)	2,32
bengálská červeň – 60 min	0,62 (0,34 – 0,85)	0,63 (0,54 – 0,72)	1,02
bengálská červeň – 120 min	0,22 (0,21 – 0,24)	0,57 (0,50 – 0,66)	2,59
bengálská červeň – 240 min	0,07 (0,07 – 0,08)	0,25 (0,24 – 0,27)	3,57

6.1.2.2. Khellin

Testované koncentrace: 5 – 0,0024 mM

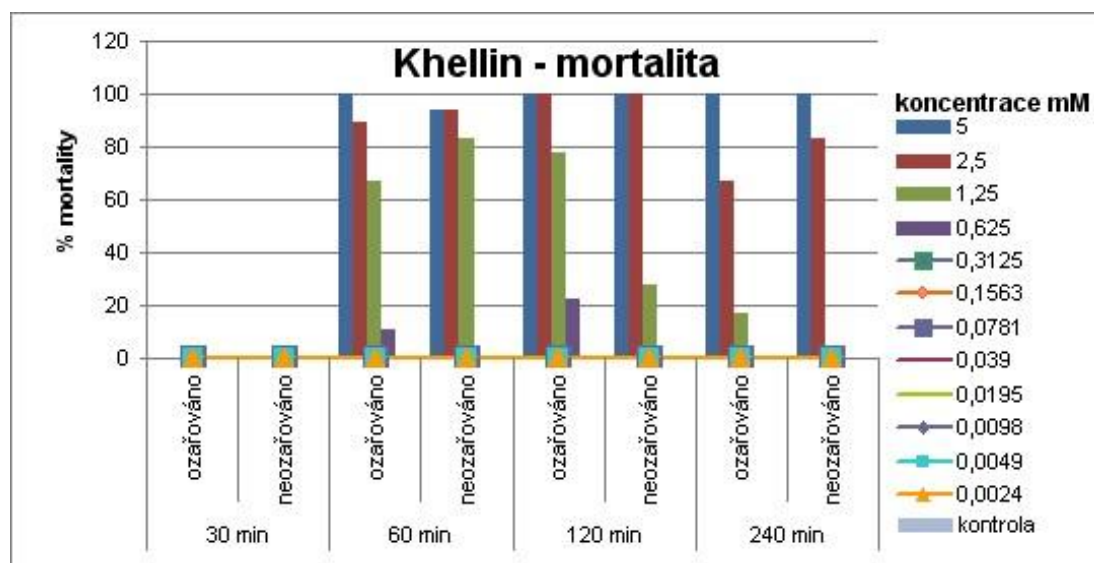
Doba působení látky v přítomnosti UVA a bez UVA: 30, 60, 120, 240 min

Vyhodnocovaný endpoint – mortalita, poškození

Tab. 5: Khellin - %±S.O. mortality nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	30 min		60 min		120 min		240 min	
	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno
5	0±0	0±0	100±0	94±9,8	100±0	100±0	100±0	100±0
2,5	0±0	0±0	89±9,8	94±9,8	100±0	100±0	67±0	83±0
1,25	0±0	0±0	67±0	83±0	78±9,2	28±19	17±0	0±0
0,625	0±0	0±0	11±9,8	0±0	22±9,2	0±0	0±0	0±0
0,3125	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,1563	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0781	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,039	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0195	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0098	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 3: Grafické vyjádření mortality nítěnek



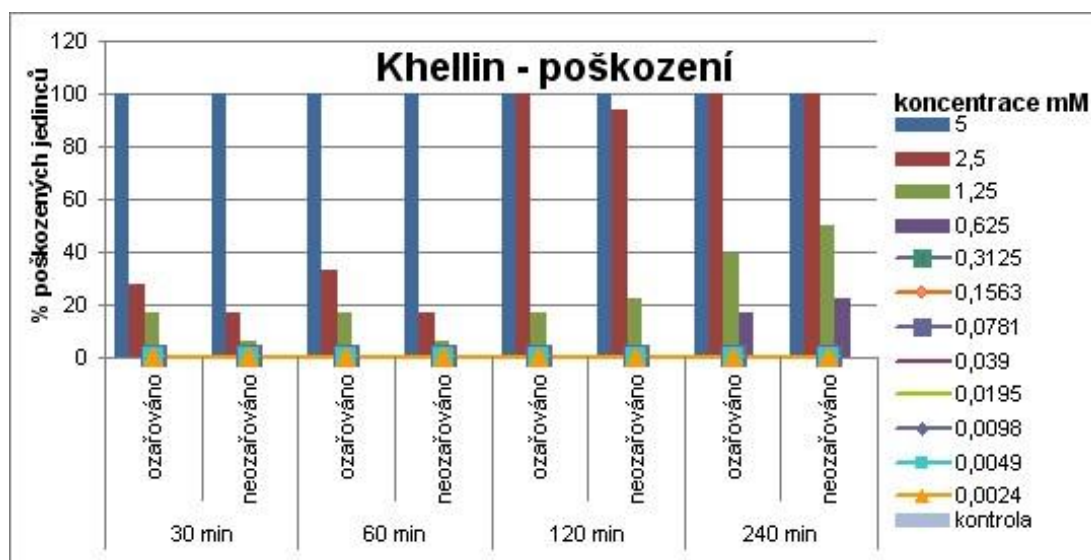
Tab. 6: Hodnoty LC₅₀ (mortalita) v mM a PIF faktoru

mM	LC ₅₀ po ozáření	LC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
khellin – 30 min	-	-	-
khellin – 60 min	1,03 (0,97 – 1,08)	1,13	1,10
khellin – 120 min	0,89 (0,85 – 0,94)	1,34 (0,04 – 45,18)	1,51
khellin – 240 min	2,12 (2,10 – 2,14)	2,20	1,04

Tab. 7: Khellin - %±S.O. poškozených nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	30 min		60 min		120 min		240 min	
	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno
5	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
2,5	28±19	17±0	33±0	17±0	100±0	94±9,8	100±0	100±0
1,25	17±0	6±9,8	17±0	6±9,8	17±0	22±9,2	39±9,8	50±0
0,625	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	17±0	22±9,2
0,3125	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,1563	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0781	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,039	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0195	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0098	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 4: Grafické vyjádření procenta poškozených nítěnek



Tab. 8: Hodnoty EC₅₀ (poškození) v mM a PIF faktoru

mM	EC ₅₀ po ozáření	EC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
khellin – 30 min	2,32 (2,18 – 2,46)	3,43	1,48
khellin – 60 min	1,45 (1,35 – 1,55)	1,43	0,99
khellin – 120 min	1,43	2,04	1,43
khellin – 240 min	1,39 (1,29 – 1,43)	1,21 (1,11 – 1,31)	0,87

6.1.2.3. Xantotoxin

Testované koncentrace: 2,5 – 0,0012 mM

Doba působení látky v přítomnosti UVA a bez UVA: 30, 60, 120 min

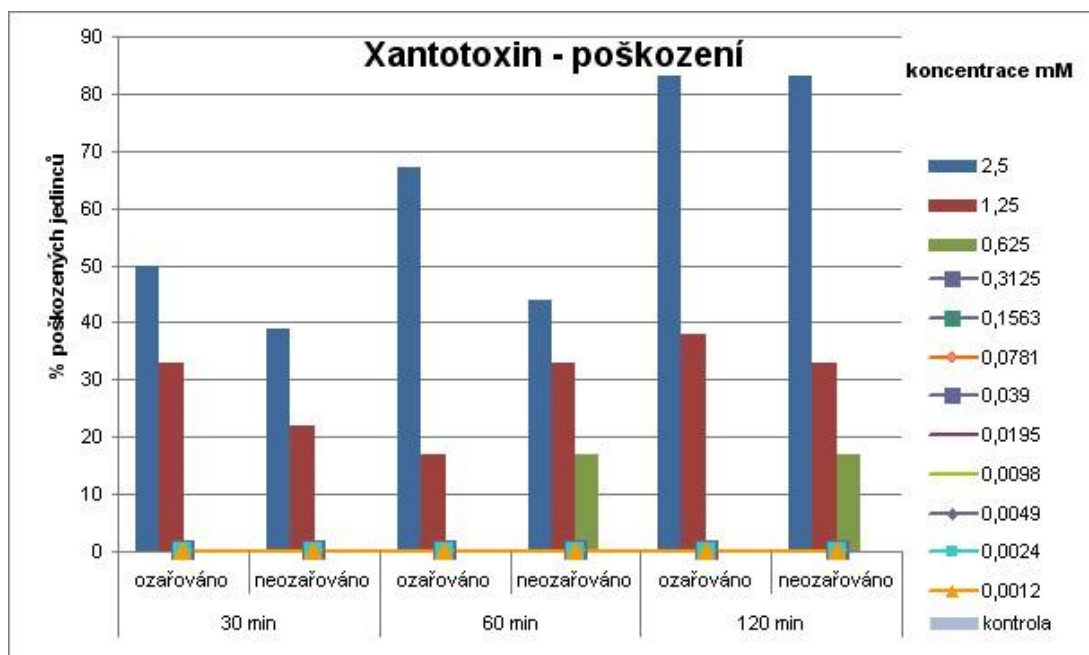
Vyhodnocovaný endpoint – mortalita, poškození

V uvedených koncentracích a v časech testování nedošlo k mortalitě, pouze k poškození.

Tab. 9: Xantotoxin - %±S.O. poškozených nítěnek v čase ozářování

koncentrace mM	30 min		60 min		120 min	
	ozářováno	neozářováno	ozářováno	neozářováno	ozářováno	neozářováno
2,5	50±0	39±9,8	67±0	44±9,8	83±0	83±0
1,25	33±0	22±9,2	17±0	33±0	38±9,8	33±0
0,625	0±0	0±0	0±0	17±0	0±0	17±0
0,3125	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,1563	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0781	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,039	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0195	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0098	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 5: Grafické vyjádření procenta poškozených nítěnek



Tab. 10: Hodnoty EC₅₀ (poškození) v mM a PIF faktoru

mM	EC ₅₀ po ozáření	EC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
xantotoxin – 30 min	2,32 (2,13 – 2,53)	3,12 (2,71 – 3,59)	1,35
xantotoxin – 60 min	2,03 (2,02 – 2,05)	2,68 (2,35 – 3,07)	1,32
xantotoxin – 120 min	1,47 (1,42 – 1,53)	1,49 (1,43 – 1,56)	1,01

6.2. Izolované aktivní přírodní látky- thiofenový polyyn, umbelliferon, skopolin, skopoletin

6.2.1. Thiofenový polyyn

Testované koncentrace: 2,5 – 0,0012 mM

Doba působení látky v přítomnosti UVA a bez UVA: 15, 30, 60, 120, 240 min

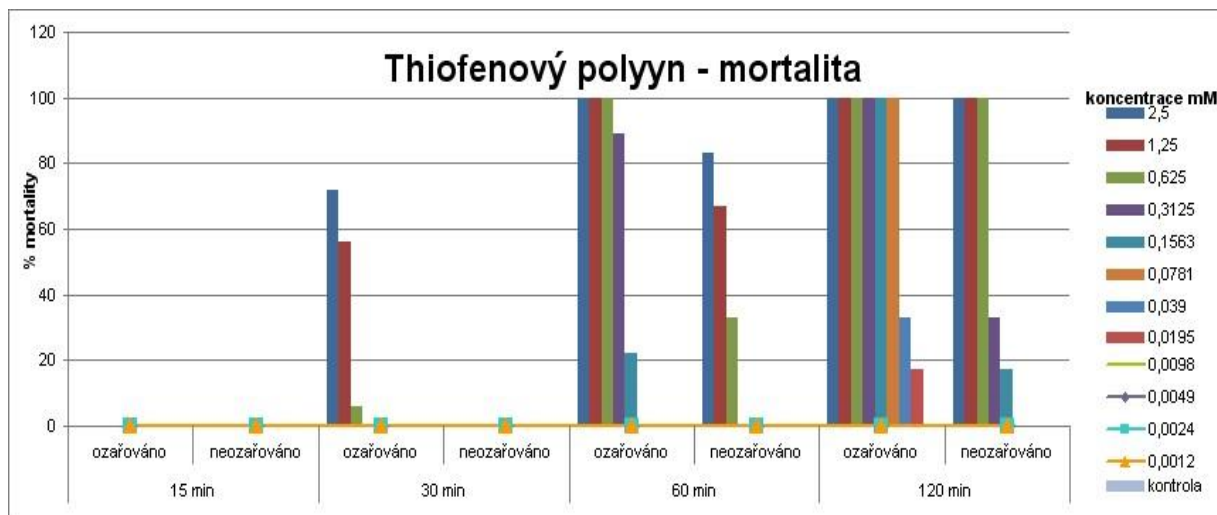
Vyhodnocovaný endpoint – mortalita, poškození

Po 240 minutách bylo dosaženo ve všech testovaných koncentracích 100% mortalita i poškození vlivem UVA i v temnostní kontrole.

Tab. 11: Thiofenový polyyn - %±S.O. mortality nítěnek v čase ozáření

koncentrace mM	15 min		30 min		60 min		120 min	
	ozářováno	neozářováno	ozářováno	neozářováno	ozářováno	neozářováno	ozářováno	neozářováno
2,5	0±0	0±0	72±9,2	0±0	100±0	83±0	100±0	100±0
1,25	0±0	0±0	56±9,8	0±0	100±0	67±0	100±0	100±0
0,625	0±0	0±0	6±9,8	0±0	100±0	33±0	100±0	100±0
0,3125	0±0	0±0	0±0	0±0	89±19	0±0	100±0	33±0
0,1563	0±0	0±0	0±0	0±0	22±9,2	0±0	100±0	17±0
0,0781	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	100±0	0±0
0,039	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	33±0	0±0
0,0195	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	17±0	0±0
0,0098	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 6: Grafické vyjádření mortality nítěnek



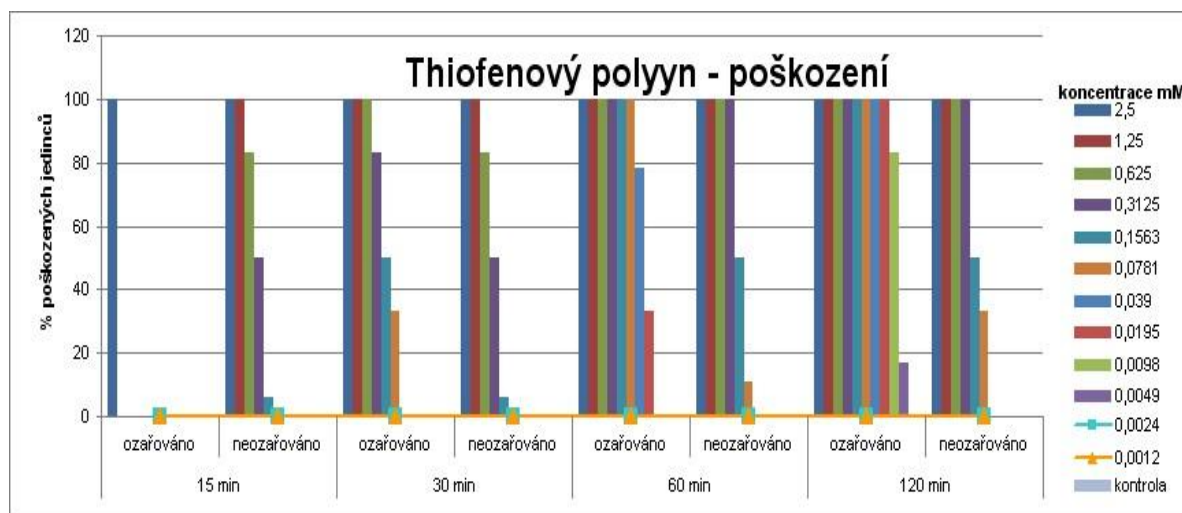
Tab. 12: Hodnoty LC₅₀ (mortalita) v mM a PIF faktoru

mM	LC ₅₀ po ozáření	LC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
thiofenový polyyn – 15 min	-	-	-
thiofenový polyyn – 30 min	1,00 (0,92 – 1,09)	-	-
thiofenový polyyn – 60 min	0,20 (0,19 – 0,22)	5,63 (4,91 – 6,44)	28,15
thiofenový polyyn – 120 min	0,04 (0,04 – 0,05)	2,30 (2,21 – 2,39)	57,5

Tab. 13: Thiofenový polyyn - %±S.O. poškozených nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	15 min		30 min		60 min		120 min	
	ozařováno	neozářováno	ozařováno	neozářováno	ozařováno	neozářováno	ozařováno	neozářováno
2,5	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
1,25	0±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
0,625	0±0	83±0	100±0	83±0	100±0	100±0	100±0	100±0
0,3125	0±0	50±0	83±0	50±0	100±0	100±0	100±0	100±0
0,1563	0±0	6±9,8	50±0	6±9,8	100±0	50±0	100±0	50±0
0,0781	0±0	0±0	33±0	0±0	100±0	11±9,8	100±0	33±0
0,039	0±0	0±0	0±0	0±0	78±9,2	0±0	100±0	0±0
0,0195	0±0	0±0	0±0	0±0	33±0	0±0	100±0	0±0
0,0098	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	83±0	0±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	17±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 7: Grafické vyjádření procenta poškozených nítěnek



Tab. 14: Hodnoty EC₅₀ (poškození) v mM a PIF faktoru

mM	EC ₅₀ po ozáření	EC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
thiofenový polyyn – 15 min	-	-	-
thiofenový polyyn – 30 min	0,14 (0,13 – 0,16)	0,32 (0,31 – 0,34)	2,29
thiofenový polyyn – 60 min	0,02 (0,02 – 0,03)	0,15 (0,14 – 0,16)	7,50
thiofenový polyyn – 120 min	0,007 (0,006 – 0,007)	0,13 (0,12 – 0,15)	18,57

Pilotní výsledky publikovány – viz. **PŘÍLOHA 3** (publikace: Vytlačilová J., Chobot V., Karlíčková J., Jahodář L., Opletal L., Pour M. (2003): *Tubifex tubifex* – a sensitive organism to the activity of phototoxins, *Folia Pharm. Univ. Carol.*, **29-30**, 107–111)

PŘÍLOHA 4 (publikace: Chobot V., Vytlačilová J., Kubicová L., Opletal L., Jahodář L., Laakso I., Vuorela P. (2006): Phototoxic activity of a thiophene polyacetylene from *Leuzea carthamoides*, *Fitoterapia*, **77**, 194-198)

6.2.2. Umbelliferon, skopoletin, skopolin

Testované látky byly získány z rostliny *Evolvulus alsinoides* L. (evolvulus kuřičkovitý). Izolací a identifikací látek se zabýval Mgr. František Červinka.

Testované koncentrace: 7,5 – 0,2344 mM (skopolin a skopoletin)

10 – 0,3125 mM (umbelliferon)

Doba působení látky v přítomnosti UVA a bez UVA: 30, 120 min

Vyhodnocovaný endpoint – mortalita, poškození

Umbelliferon a skopolin: ve všech testovaných koncentracích při expozici 30 min i 120 min nedošlo k poškození nitěnek ani k mortalitě jak při ozařování, tak i v temnostních kontrolách.

Výsledky pro **umbelliferon:**

1. po ozařování 0,5 h i po ozařování 2 h nebyly pozorovány změny mortality ani poškození
2. byl vyzkoušen upravený design experimentu, kdy byli jedinci v přítomnosti fotosenzibilizátoru ozařováni 2 h, výsledky byly odečítány až po 24 hodinách od počátku experimentu
3. po 24 hodinách byla zaznamenána pouze mortalita, žádné poškození nebylo pozorováno
4. 100% mortalita byla vyhodnocena v případě ozářených jedinců až do koncentrace 3,33 mM

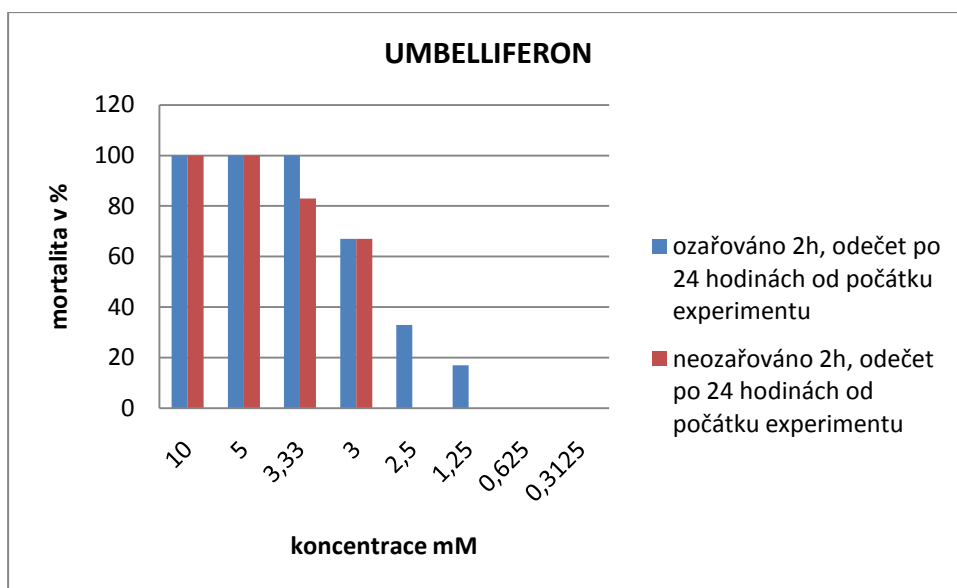
5. temnostní kontrola vykazala 100% mortalitu pouze ve dvou nejvyšších koncentracích (10 mM, 5 mM)

6. nelineární regresní analýzou byly vypočteny hodnoty:

ozařování jedinci $LC_{50} = 1,413 \text{ mM}$
s 95% intervaly spolehlivosti (1,364 - 1,463 mM)

neozařování jedinci (temnostní kontrola) $LC_{50} = 2,914 \text{ mM}$
s 95% intervaly spolehlivosti (2,877 - 2,951 mM)

Graf 8: Grafické vyjádření mortality nítěnek

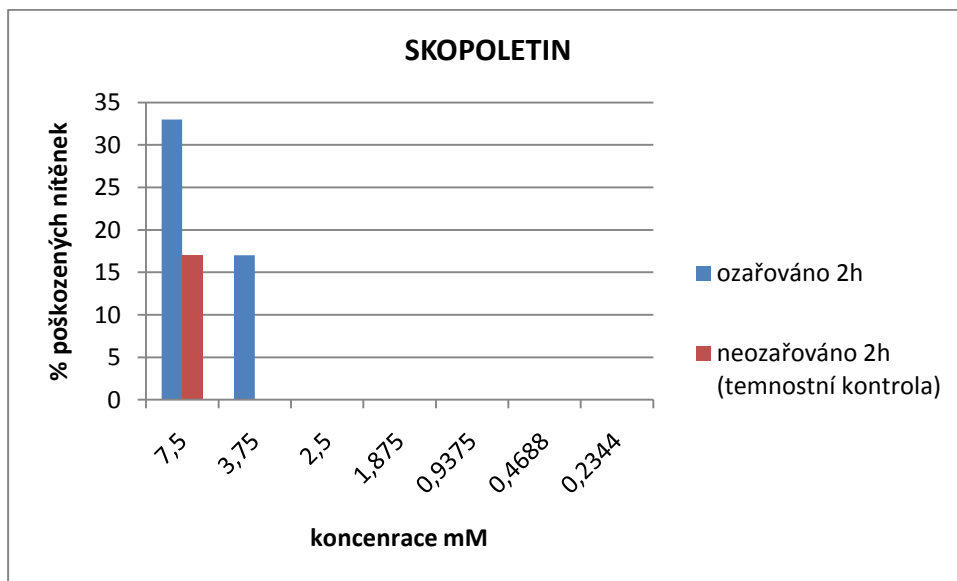


Výsledky pro **skopolin**:

1. po ozařování 0,5 h i po ozařování 2 h nebyly pozorovány změny mortality ani poškození
2. byl vyzkoušen upravený design experimentu, kdy byli jedinci v přítomnosti fotosenzibilizátoru ozařováni 2 h, výsledky byly odečítány až po 24 hodinách od počátku experimentu
3. po 24 hodinách byla zaznamenána mortalita i poškození u ozařovaných jedinců v přítomnosti fotosenzibilizátoru

- po 120 min zaznamenáno pouze poškození u 33 % ozařovaných jedinců v přítomnosti scopoletinu v nejvyšší koncentraci (7,5 mM), temnostní kontrola vykazala 17 % poškozených jedinců; ve druhé testované koncentraci (3,75 mM) bylo zjištěno 17 % poškozených ozářených jedinců v koncentraci 3,75 mM, u temnostní kontroly 0 %
- destička se skopoletinem pod UVA lampou modře fluoreskovala

Graf 10: Grafické vyjádření procenta poškozených nítěnek



6.3. Syntetické látky – salicylanilidy (2), thiosalicylanilidy (1+5)

6.3.1. Salicylanilidy

- 3',4',5-trichlorsalicylanilid
- 4',5-dibromsalicylanilid

Testované koncentrace: 5 – 0,0024 mM

Doba působení látky v přítomnosti UVA a bez UVA: 15, 30, 45, 60 min

Vyhodnocovaný endpoint – mortalita, poškození

Při rozpouštění látek využit ultrazvuk a přidání DMSO v 1% obj. DMSO v této koncentraci neovlivňuje mortalitu ani poškození nítěnek – ve všech kontrolách byl obsažen 1% obj. DMSO také.

3',4',5-trichlorsalicylanilid

Vykazoval v průběhu všech testů ve studovaných koncentracích a časech ozařování po expozici látky i v temnostních kontrolách 0% mortalitu a 0% poškození.

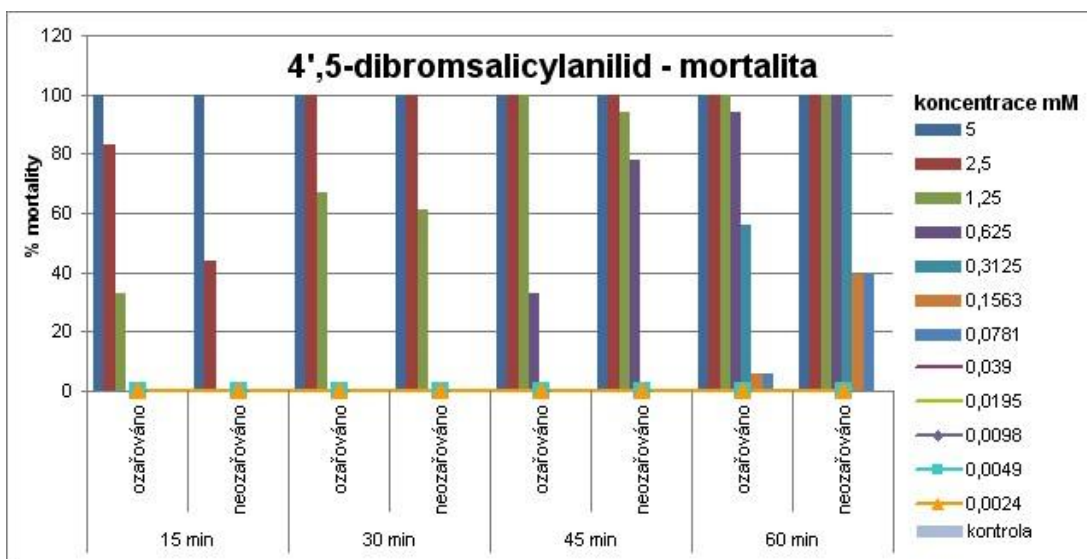
4',5-dibromsalicylanilid

Vykazoval pouze mortalitu.

Tab. 15: 4',5-dibromsalicylanilid - %±S.O. mortality nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	15 min		30 min		45 min		60 min	
	ozařeno	neozářeno	ozařeno	neozářeno	ozařeno	neozářeno	ozařeno	neozářeno
5	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
2,5	83±0	44±9,8	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
1,25	33±0	0±0	67±0	61±9,8	100±0	94±9,8	100±0	100±0
0,625	0±0	0±0	0±0	0±0	33±0	78±9,2	94±9,8	100±0
0,3125	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	56±9,8	100±0
0,1563	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	6±9,8	39±9,8
0,0781	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	6±0	39±9,8
0,039	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0195	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0098	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 11: Grafické vyjádření mortality nítěnek



Tab. 16: Hodnoty LC₅₀ (mortalita) v mM a PIF faktoru

mM	LC ₅₀ po ozáření	LC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
4',5-dibromsalicylanilid – 15 min	1,54 (1,51 – 1,58)	2,54 (1,34 – 4,81)	1,65
4',5-dibromsalicylanilid – 30 min	1,23	1,22 (0,07 – 20,50)	0,99
4',5-dibromsalicylanilid – 45 min	0,64	1,18	1,84
4',5-dibromsalicylanilid – 60 min	0,30 (0,28 – 0,32)	0,16 (0,002 – 14,59)	0,53

6.3.2. Thiosalicylanilidy

- thiosalicylanilid
- 4'-methylthiosalicylanilid
- 5-chlorthiosalicylanilid
- 3',4'-dichlorthiosalicylanilid
- 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid
- 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid

Testované koncentrace: 1,25 – 0,0006 mM

Doba působení látky v přítomnosti UVA a bez UVA: 60, 120 min

Vyhodnocovaný endpoint – mortalita, poškození

Při rozpouštění látek využít ultrazvuk a přidání DMSO v 1% obj. DMSO v této koncentraci neovlivňuje mortalitu ani poškození nítěnek – ve všech kontrolách byl obsažen 1% obj. DMSO také.

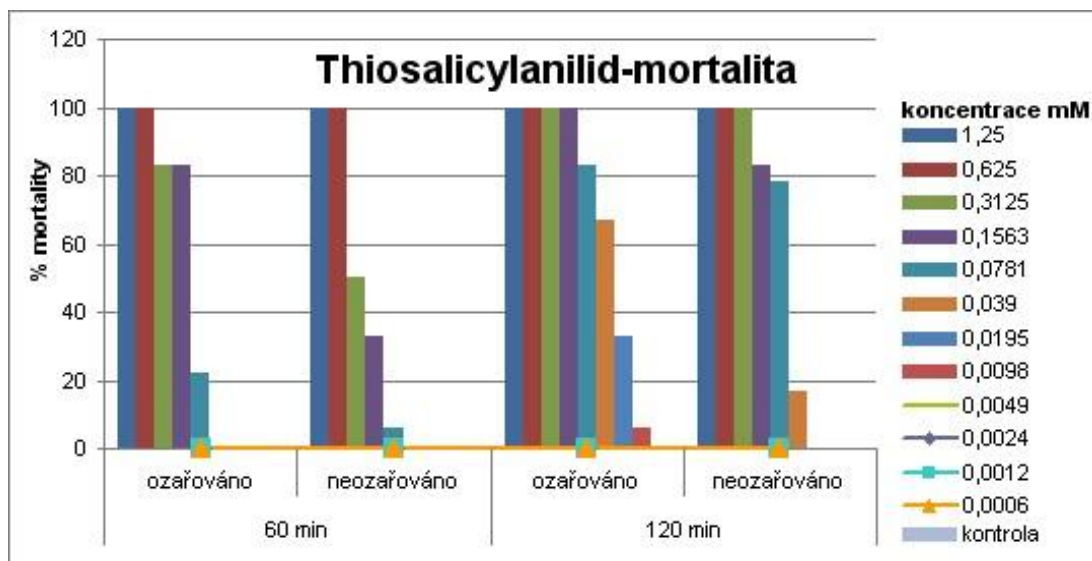
Thiosalicylanilid

V testovaných časech ozařování i u temnostních kontrol nedošlo v žádné koncentraci k poškození.

Tab. 17: Thiosalicylanilid - %±S.O. mortality nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	60 min		120 min	
	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno
1,25	100±0	100±0	100±0	100±0
0,625	100±0	100±0	100±0	100±0
0,3125	83±0	50±0	100±0	100±0
0,1563	83±0	33±0	100±0	83±0
0,0781	22±9,2	6±9,8	83±0	72±9,2
0,039	0±0	0±0	67±0	17±0
0,0195	0±0	0±0	33±0	0±0
0,0098	0±0	0±0	6±9,8	0±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0006	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 12: Grafické vyjádření mortality nítěnek



Tab. 18: Hodnoty LC₅₀ (mortalita) v mM a PIF faktoru

mM	LC ₅₀ po ozáření	LC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
thiosalicylanilid – 60 min	0,123 (0,088 – 0,173)	0,251 (0,188 – 0,335)	2,04
thiosalicylanilid – 120 min	0,030 (0,023 – 0,038)	0,064 (0,046 – 0,088)	2,13

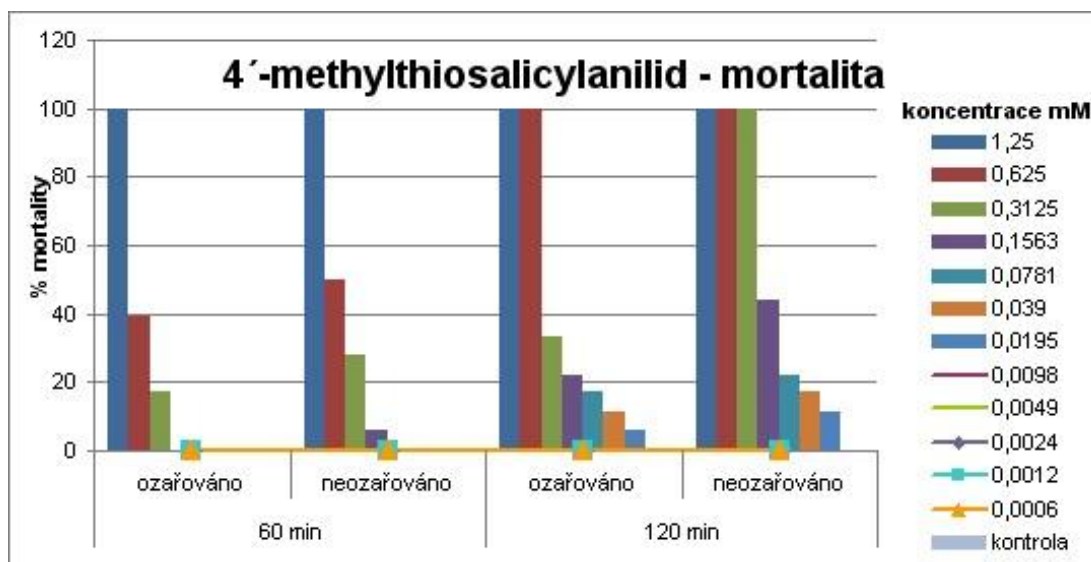
4'-methylthiosalicylanilid

V testovaných časech ozařování i u temnostních kontrol nedošlo v žádné koncentraci k poškození.

Tab. 19: 4'-methylthiosalicylanilid - %±S.O. mortality nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	60 min		120 min	
	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno
1,25	100±0	100±0	100±0	100±0
0,625	39±9,8	50±0	100±0	100±0
0,3125	17±0	28±9,2	33±0	100±0
0,1563	0±0	6±9,8	22±9,2	44±9,8
0,0781	0±0	0±0	17±0	22±9,2
0,039	0±0	0±0	11±9,8	17±0
0,0195	0±0	0±0	6±0	11±9,8
0,0098	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0006	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 13: Grafické vyjádření mortality nítěnek



Tab. 20: Hodnoty LC₅₀ (mortalita) v mM a PIF faktoru

mM	LC ₅₀ po ozáření	LC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
4'-methylthiosalicylanilid – 60 min	0,640 (0,452 – 0,906)	0,507 (0,381 – 0,676)	0,79
4'-methylthiosalicylanilid – 120 min	0,260 (0,192 – 0,352)	0,124 (0,093 – 0,166)	0,48

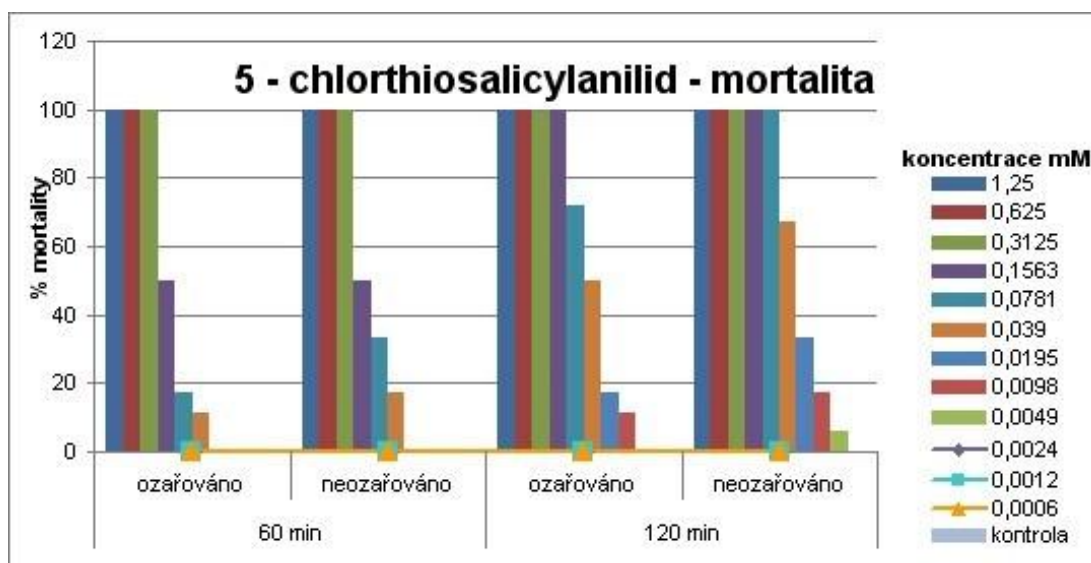
5-chlorthiosalicylanilid

V testovaných časech ozařování i u temnostních kontrol nedošlo v žádné koncentraci k poškození.

Tab. 21: 5-chlorthiosalicylanilid - %±S.O. mortality nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	60 min		120 min	
	ozařováno	neozářováno	ozařováno	neozářováno
1,25	100±0	100±0	100±0	100±0
0,625	100±0	100±0	100±0	100±0
0,3125	100±0	100±0	100±0	100±0
0,1563	50±0	50±0	100±0	100±0
0,0781	17±0	33±0	72±9,2	100±0
0,039	11±9,8	17±0	50±0	67±0
0,0195	0±0	0±0	17±0	33±0
0,0098	0±0	0±0	11±9,8	17±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	6±9,8
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0006	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 14: Grafické vyjádření mortality nítěnek



Tab. 22: Hodnoty LC_{50} (mortalita) v mM a PIF faktoru

mM	LC_{50} po ozáření	LC_{50} bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
5 – chlorthiosalicylanilid – 60 min	0,134 (0,098 – 0,183)	0,115 (0,088 – 0,149)	0,86
5 – chlorthiosalicylanilid – 120 min	0,040 (0,032 – 0,051)	0,025 (0,019 – 0,031)	0,63

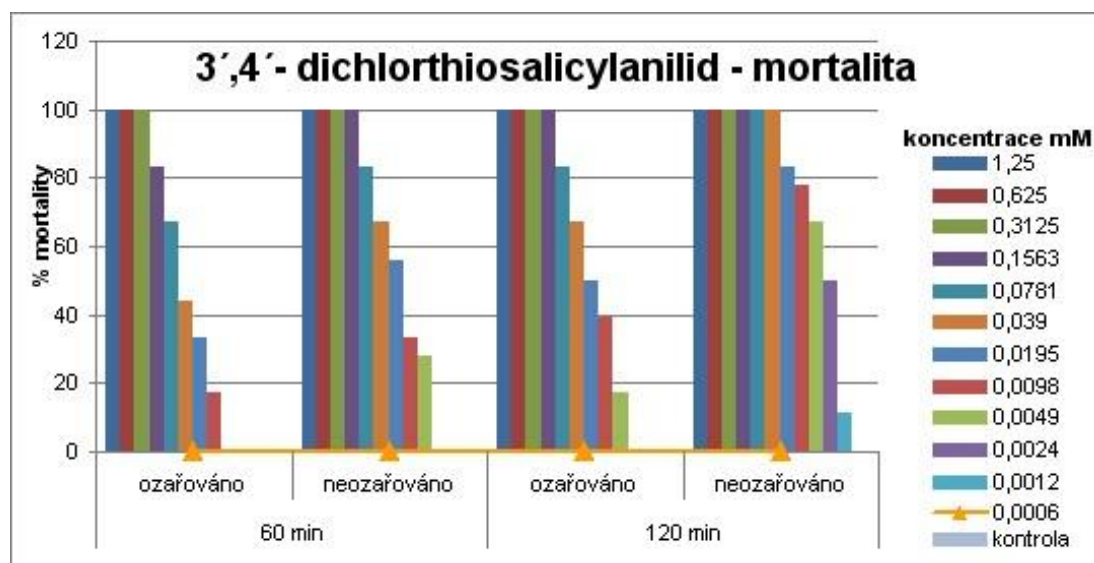
3',4'-dichlorthiosalicylanilid

V testovaných časech ozářování i u temnostních kontrol nedošlo v žádné koncentraci k poškození.

Tab. 23: 3',4'-dichlorthiosalicylanilid - %±S.O. mortality nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	60 min		120 min	
	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno
1,25	100±0	100±0	100±0	100±0
0,625	100±0	100±0	100±0	100±0
0,3125	100±0	100±0	100±0	100±0
0,1563	83±0	100±0	100±0	100±0
0,0781	67±0	83±0	83±0	100±0
0,039	44±9,8	67±0	67±0	100±0
0,0195	33±0	56±9,8	50±0	83±0
0,0098	17±0	33±0	39±9,8	78±9,2
0,0049	0±0	28±0	17±0	67±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	50±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	11±9,8
0,0006	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 15: Grafické vyjádření mortality nítěnek



Tab. 24: Hodnoty LC₅₀ (mortalita) v mM a PIF faktoru

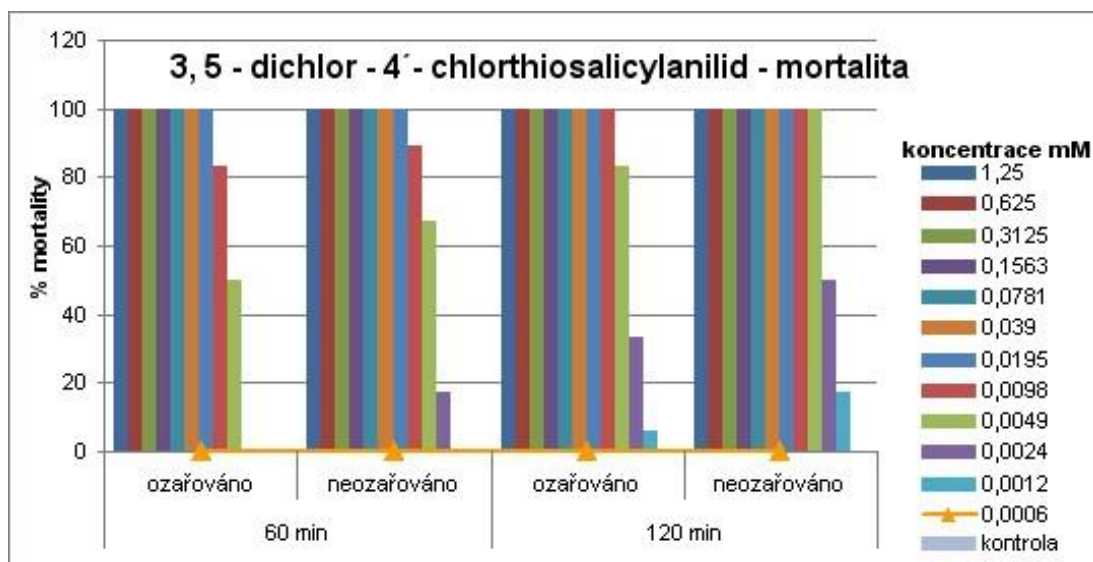
mM	LC ₅₀ po ozáření	LC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
3',4'-dichlorthiosalicylanilid – 60 min	0,041 (0,036 – 0,048)	0,017 (0,014 – 0,020)	0,41
3',4'-dichlorthiosalicylanilid – 120 min	0,187 (0,016 – 0,022)	0,003 (0,003 – 0,004)	0,02

3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid

Tab. 25: 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid - %±S.O. mortality nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	60 min		120 min	
	ozařováno	neozářováno	ozařováno	neozářováno
1,25	100±0	100±0	100±0	100±0
0,625	100±0	100±0	100±0	100±0
0,3125	100±0	100±0	100±0	100±0
0,1563	100±0	100±0	100±0	100±0
0,0781	100±0	100±0	100±0	100±0
0,039	100±0	100±0	100±0	100±0
0,0195	100±0	100±0	100±0	100±0
0,0098	83±0	89±9,8	100±0	100±0
0,0049	50±0	67±0	83±0	100±0
0,0024	0±0	17±0	33±0	50±0
0,0012	0±0	0±0	6±9,8	17±0
0,0006	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 16: Grafické vyjádření mortality nítěnek



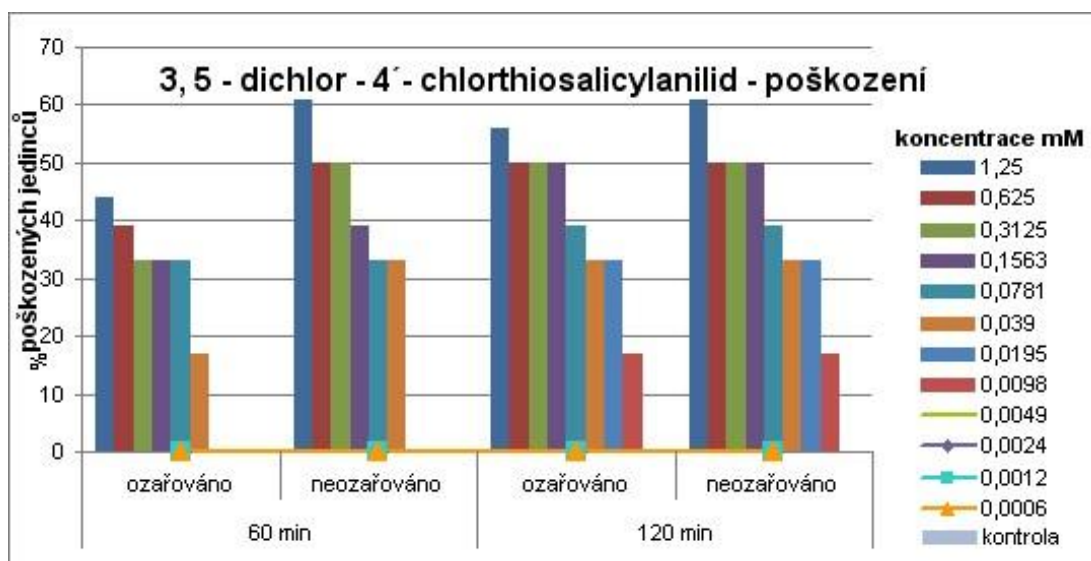
Tab. 26: Hodnoty LC₅₀ (mortalita) v mM a PIF faktoru

mM	LC ₅₀ po ozáření	LC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
3, 5 - dichlor - 4' - chlorthiosalicylanilid – 60 min	0,005 (0,004 – 0,007)	0,004 (0,003 – 0,006)	0,80
3, 5 - dichlor - 4' - chlorthiosalicylanilid – 120 min	0,003 (0,002 – 0,004)	0,002 (0,001 – 0,003)	0,67

Tab. 27: 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid - %±S.O. poškozených nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	60 min		120 min	
	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno
1,25	44±9,8	61±9,8	56±9,8	61±9,8
0,625	39±9,8	50±0	50±0	50±0
0,3125	33±0	50±0	50±0	50±0
0,1563	33±0	39±9,8	50±0	50±0
0,0781	33±0	33±0	39±9,8	39±9,8
0,039	17±0	33±0	33±0	33±0
0,0195	0±0	0±0	33±0	33±0
0,0098	0±0	0±0	17±0	17±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0006	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 17: Grafické vyjádření procenta poškozených nítěnek



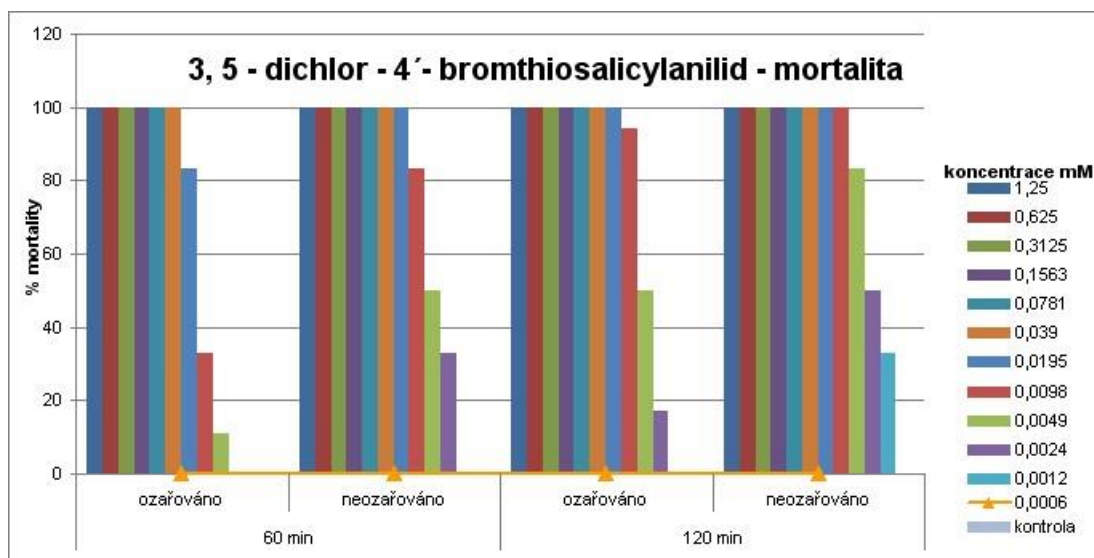
Tab. 28: Hodnoty EC₅₀ (poškození) v mM a PIF faktoru

mM	EC ₅₀ po ozáření	EC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
3, 5 - dichlor - 4' - chlorthiosalicylanilid – 60 min	1,264 (0,775 – 2,063)	0,297 (0,206 – 0,427)	0,23
3, 5 - dichlor - 4' - chlorthiosalicylanilid – 120 min	0,346 (0,229 – 0,523)	0,306 (0,212 – 0,441)	0,88

3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid**Tab. 29:** 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid - %±S.O. mortality nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	60 min		120 min	
	ozařováno	neozářováno	ozařováno	neozářováno
1,25	100±0	100±0	100±0	100±0
0,625	100±0	100±0	100±0	100±0
0,3125	100±0	100±0	100±0	100±0
0,1563	100±0	100±0	100±0	100±0
0,0781	100±0	100±0	100±0	100±0
0,039	100±0	100±0	100±0	100±0
0,0195	83±0	100±0	100±0	100±0
0,0098	33±0	83±0	94±9,8	100±0
0,0049	11±9,8	50±0	50±0	83±0
0,0024	0±0	33±0	17±0	50±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	33±0
0,0006	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 18: Grafické vyjádření mortality nítěnek



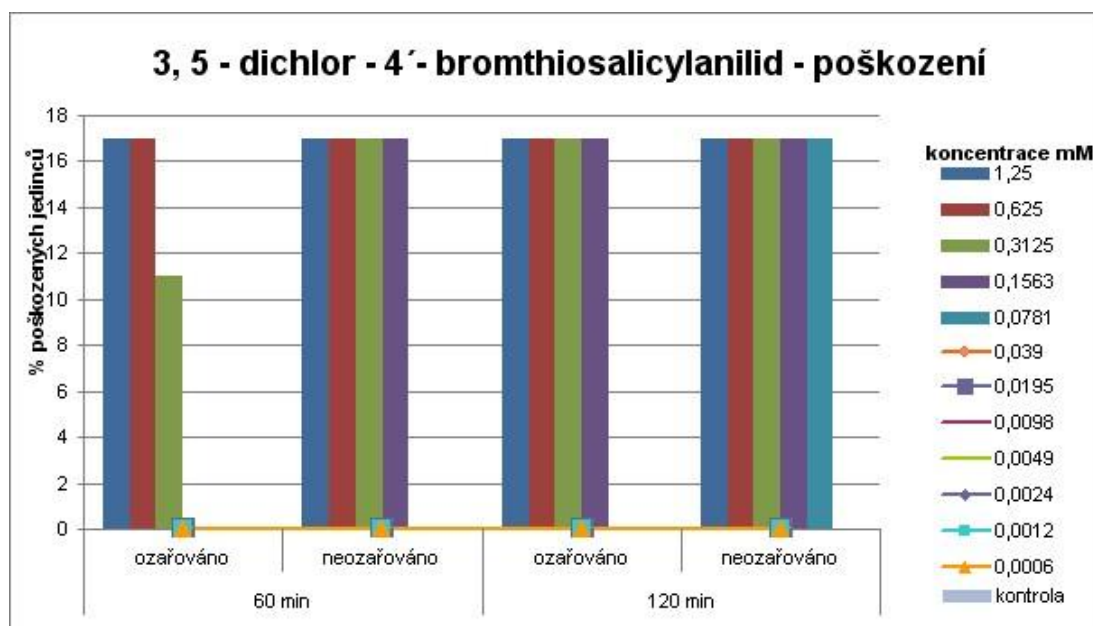
Tab. 30: Hodnoty LC₅₀ (mortalita) v mM a PIF faktoru

mM	LC ₅₀ po ozáření	LC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
3, 5 - dichlor - 4' - bromthiosalicylanilid – 60 min	0,012 (0,008 – 0,016)	0,004 (0,003 – 0,006)	0,33
3, 5 - dichlor - 4' - bromthiosalicylanilid – 120 min	0,005 (0,003 – 0,006)	0,002 (0,001 – 0,002)	0,40

Tab. 31: 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid - %±S.O. poškozených nítěnek v čase ozařování

koncentrace mM	60 min		120 min	
	ozařováno	neozařováno	ozařováno	neozařováno
1,25	17±0	17±0	17±0	17±0
0,625	17±0	17±0	17±0	17±0
0,3125	11±9,8	17±0	17±0	17±0
0,1563	0±0	17±0	17±0	17±0
0,0781	0±0	0±0	0±0	17±0
0,039	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0195	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0098	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0049	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0024	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0012	0±0	0±0	0±0	0±0
0,0006	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 19: Grafické vyjádření procenta poškozených nítěnek



Tab. 32: Hodnoty LC₅₀ (poškození) v mM a PIF faktoru

mM	EC ₅₀ po ozáření	EC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
3, 5 - dichlor - 4'- bromthiosalicylanilid – 60 min	-	-	-
3, 5 - dichlor - 4'- bromthiosalicylanilid – 120 min	-	-	-

Pzn. Nešlo spočítat.

6.3.3. Léčiva – standard účinné látky antibiotika (amoxicilin), léčiva Augmentin a Ospamox

Testované koncentrace: 102,5 – 0,05 mM

Doba působení látky v přítomnosti UVA a bez UVA: 30 min

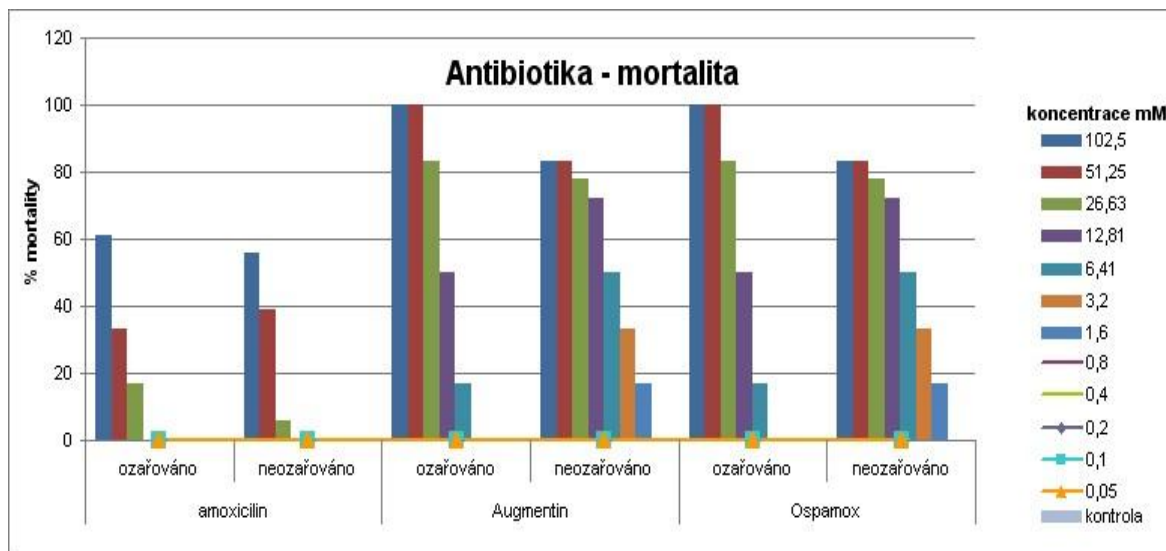
Vyhodnocovaný endpoint – mortalita, poškození

V průběhu 30 minutové expozice (standardní účinné látky – amoxicilinu; léčiv – Augmentinu a Ospamoxu) nedošlo k poškození u ozařovaných jedinců ani v případě jedinců z temnostních kontrol.

Tab. 33: Amoxicilin, léčiva – Augmentin, Ospamox - %±S.O. mortality nítěnek po 30 min expozici

koncentrace mM	amoxicilin		Augmentin		Ospamox	
	ozařováno	neozářováno	ozařováno	neozářováno	ozařováno	neozářováno
102,5	61±9,8	56±9,8	100±0	83±0	100±0	100±0
51,25	33±0	39±19	100±0	83±0	100±0	100±0
26,63	17±0	6±9,8	83±0	78±0	56±9,8	61±9,8
12,81	0±0	0±0	50±0	72±9,2	0±0	22±9,2
6,41	0±0	0±0	17±0	50±0	0±0	0±0
3,2	0±0	0±0	0±0	33±0	0±0	0±0
1,6	0±0	0±0	0±0	17±0	0±0	0±0
0,8	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,4	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,2	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,1	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
0,05	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
kontrola	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Graf 20: Grafické vyjádření mortality nítěnek



Tab. 34: Hodnoty LC₅₀ (mortalita) v mM a PIF faktoru

mM	LC ₅₀ po ozáření	LC ₅₀ bez ozáření	PIF faktor
	(95% interval spolehlivosti)		
amoxicilin (standard účinné látky)	98,93 (83,62 – 117,1)	110,9 (85,71 – 143,4)	1,14
Augmentin (léčivo)	13,11 (9,873 – 17,40)	4,57 (0,1860 – 112,1)	0,35
Ospamox (léčivo)	25,88 (17,12 – 39,14)	21,18 (15,00 – 29,89)	0,82

7. Diskuse

7.1. Optimalizace metody hodnocení

Tato práce byla zaměřena na „Využití kroužkovce *Tubifex tubifex* Müll. jako modelu pro testování biologické aktivity“. Většina dosavadních prací byla založena na hodnocení schopnosti bioakumulace, bioeliminace těžkých kovů a stanovení toxicity těžkých kovů nítěnkou v přirozených či experimentálních podmínkách (Bouché et al., 2000; Bouché et al., 1999a; Kaonga et al., 2010, Gillis et al., 2004a; Gillis et al., 2004b; Fargačová, 1994; Mosleh et al., 2006; Rathore et al., 2002; Khangarot et al., 2003). Stanovení bioakumulace lipofilních látek – dříve používaných pesticidů (hexachlorbenzen, lindan a metabolit, vzniklý rozkladem pesticidů – dichloranilin) (Egeler et al., 1999). Nebo pro hodnocení testů toxicity reálných vzorků sedimentů (Smutná et al., 2008).

Soni a Joshi (1997) ve své studii ozařovali *Tubifex tubifex* UVA, UVB, UVC a přímým slunečním světlem aby demonstrovali změny v chování. Vystavení nízkenergetickému dlouhovlnnému UVA záření *Tubifex tubifex* nepoškozuje. Nejvíce toxické se projevilo vysokoenergetické krátkovlnné UVC záření, v praxi nemá význam, neboť je atmosférou odfiltrováno a k zemskému povrchu se nedostane. Nejzávažnější zjištění bylo zaznamenáno při použití UVB záření, kde i malý vzrůst dávky měl za následek výrazné zvýšení mortality nítěnek (Soni et al., 1997). V roce 2001 navázal na předcházející studii opět tým indických autorů. Vycházel z předpokladu, že UVB záření indukuje mortalitu nítěnek a podílí se na produkci reaktivních forem kyslíku (singletového kyslíku, superoxid anion radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu) nítěnkami (Misra et al., 2002).

Předkládaná práce byla zaměřena na hodnocení vlivu fotosenzibilizátorů ve spojitosti s UVA zářením. Samotné UVA záření nezpůsobovalo poškození ani mortalitu nítěnek v souladu s poznatky Soni a Joshiho (1997) a bylo potvrzeno (Vytačilovou et al, 2004). První část projektu zahrnovala využití v praxi používaných fotosenzibilizátorů – bengálská červeň, khellin a xantotoxin. Uvedené látky sloužily k odhalení citlivosti modelového organismu – stanovení endpointů (% mortality a % poškozených jedinců) pozorováním pod skenovacím mikroskopem. Na obr. 5 je

znázorněn vliv khellinu na nítěnku za spolupůsobení UVA záření a bez UVA. Již sám khellin měl vliv na deformaci těla zejména ve střední části. Docházelo k zaškrcování, které autoři Bouché et al. popisují v případech, kdy kontaminovaná nítěnka se zbavuje svého xenobiotika (mědi a olova), které přesune do koncové části těla, kterou posléze oddělí. Zároveň popisuje, že měď ani olovo nepoškozovalo prostomium (Bouché et al., 1999). Při studiu vlivu fotosenzibilizátoru na nítěnku bylo pozorováno poškození, ale i v oblasti prostomia. Na obr. 5, H byla zjištěna lehká deformace vlivem fotosenzibilizátoru khellinu při 30 min ozařování. Bengálská červeň (viz. publikace **PŘÍLOHA 2**) způsobila patologické změny jak v případě 30 min ozařování tak bez ozařování. Tato zjištění dokládá, že khellin nemá fototoxický erytémový efekt (Slováková et al., 2009; Malina, 1999), proto se v praxi využívá v KUVA terapii. Bengálská červeň vykazovala vysokou fotosenzibilizaci, která byla projevem vytváření singletového kyslíku nebo tvorby reaktivních radikálů (Fini et al., 2004; Rajedran et al., 2004; Mothilal, 2004).

Výše uvedená zjištění vedla k určení endpointu hodnocení fotosenzibilizátorů – mortality nítěnek a procenta poškozených nítěnek (zahrnovalo vizuální vyšetření přední části – prostomia a střední části nítěnky) a navržení metodiky pro stanovení stupně fotosenzibilizace. Testování vycházelo z předpokladu, že pro experiment jsou vybrány pokusné organismy, které jsou kvantifikovány živou hmotností (14 – 20 mg) a před započítáním experimentu jsou v adaptačním akváriu nejméně 1 týden, optimálně 14 dnů, krmeny TetraMinem bez obsahu antioxidantů a fotosenzibilizujících látek (chlorofyl, betakaroten,...). Výjimku tvořily látky nutné pro správný průběh metabolismu organismu. Rathore a Khangarot aklimatizovali nítěnky na experimentální podmínky 48 – 96 h pro studium vlivu teploty na toxicitu těžkých kovů (Rathore et al., 2002). Mosleh et al. (2005) před hodnocením produkce metallothioneinu a růstových změn vlivem fungicidu fenhexamidu nechali adaptovat nítěnky po dobu 6 měsíců v akváriu při teplotě 21 ± 1 °C. Pro studium potravní preference nechali autoři adaptovat nítěnky v umělém sedimentu 4 týdny, voda byla provzdušňována a nítěnky byly krmeny TetraMinem (Rodriguez et al., 2001).

Z důvodu možné interakce fotosezibilizátoru se složkami z uměle připravené standardní vody, probíhaly experimenty v deionizované vodě. Nebyl prokázán negativní efekt deionizované vody – viz. Obr. 5 a publikace (Vytlačilová et al., 2004): Příloha 2. Tyto závěry potvrzují porovnání obrázků z našich experimentů s obrázky v publikaci Bouche et al. (1999), přestože oni používali místní pramenitou vodu.

7.2. Testované látky

7.2.1. Bengálská červeň

Jedná se o typického zástupce fotosenzibilizujících látek II. typu známé tím, že po stimulaci viditelnou oblastí světla dochází k vytváření singletového kyslíku; v přítomnosti kyslíku zahrnuje reakce excitovaného fotosenzibilizantu II. typu především přenos excitační energie z fotosezibilizantu na molekulový kyslík za vzniku singletového kyslíku (Fischer et al., 2004). Z našich závěrů vyplývá, že nejvyšší fotoiritační potenciál (PIF = 5,72) byl dosažen po 30 minutách ozařování, při hodnocení mortality. Pro výrazný fotoiritační potenciál, který se projevil po krátké době ozařování, byla bengálská červeň zvolena jako pozitivní kontrola při všech dalších experimentech. Při vyhodnocení % poškozených jedinců, po 30 min ozařování, byl PIF = 2,32. Vzáůstající dobou ozařování narůstal PIF faktor při hodnocení % poškozených jedinců s výjimkou 60 min – po 120 min PIF = 2,59 a po 240 min PIF = 3,57. Naopak při zhodnocení výsledků pro mortalitu vyplývá, že právě nejvyšší hodnota PIF faktoru (největší rozdíl LC_{50} při ozáření a bez ozáření) byla dosažena při nejnižší expozici – 30 min. Po 60 min klesla $PIF < 2$ (1,87) a při delším ozařování (120, 240 min) se držela $2 < PIF < 2,5$. Mortalita byla vyhodnocena jako citlivější endpoint ve srovnání s % poškozených jedinců.

7.2.2. Khellin

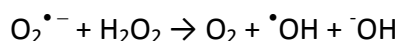
Khellin je slabý fotodynamický senzibilizátor typu I (indukuje vznik radikálů) a typu II (indukuje vznik singletového kyslíku) (Abeysekera et al., 1983). U khellinu nedošlo po 30 min ozařování k mortalitě, ani v případě neozářených jedinců. Při hodnocení mortality se fotoiritační faktor pohyboval $1 < PIF < 1,5$. Při porovnání

fotoiritačního faktoru při poškození byl nejvyšší PIF faktor dosažen právě po 30 min expozici khellinu, naopak nejnižší při 240 min expozici PIF = 0,87.

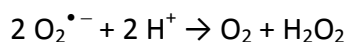
7.2.3. Xanthotoxin

Xanthotoxin (8-methoxypsoralen) je derivátem lineárních furokumarinů, které jsou známy svou fototoxicitou (Ebermann et al, 1996). Psoraleny po excitaci UVA zářením v přítomnosti kyslíku generují různé radikály a reaktivní formy kyslíku, ale především superoxidový anionradikál ($O_2^{\bullet -}$) (Llano et al., 2003). Chobot et al. zjistili, že xanthotoxin byl méně aktivní ve fotodegradaci histidinu *in vitro* než thiofenový polyyn - zdroj singletového kyslíku (tato látka bude diskutována dále – viz. thiofenový polyn) (Chobot et al., 2006). Aminokyselina histidin snadno postupuje degradační reakce s reaktivními formami kyslíku, zvláště se singletovým kyslíkem (Wade & Tucker, 1998, Lovell & Jones, 2000). Toto pozorování ukazuje, že hlavní fototoxické působení xanthotoxinu není založeno na tvorbě singletového kyslíku, ale na vzniku jiných reaktivních látek. Tyto výsledky podporují i fototoxikologické studie prováděné na *Artemia salina* (Ojala et al., 1999, Vytlačilová et al., 2004, Chobot et al., 2006). Tento korýš je citlivý k účinkům superoxidového anionradikálu (Matthes, 1995), který může za katalýzy železitých iontů vstoupit do Harberovy-Weissovy reakce. Produktem uvedené reakce je silně reaktivní a cytotoxický hydroxylový radikál ($^{\bullet}OH$) (Halliwell & Gutteridge, 1984).

Železitými ionty (Fe^{III}) katalysovaná Harberova-Weissova reakce:



Peroxid vodíku (H_2O_2) vzniká samovolnou nebo katalysovanou dismutací superoxidového anionradikálu:



Nítěnka byla dle výsledků uvedených v této disertační práci relativně méně citlivá k fototoxicitě xanthotoxinu v porovnání s fotosenzibilizanty produkujícími zejména singletový kyslík jako např. bengálská červeň nebo dále zmíněný thiofenový polyyn. Tento výsledek naznačuje, že nítěnka větší by byla vhodným testovacím

organismem pro fotosenzibilizanty II typu, které produkují po excitaci UVA zářením především singletový kyslík. Tím však není snížena ani její možná hodnota jako zkušebního organismu i pro další typy fotosenzibilizantů, protože i zde je patrná určitá citlivost. Poškození ve skupině temnostních kontrol bylo pravděpodobně způsobeno vlivem xanthotoxinu na vápníkové kanály. Furokumariny jsou blokátory těchto kanálů (Vuorela et al., 1997).

Při porovnání výsledků, které byly dosaženy v publikaci viz. **PŘÍLOHA 5** : Vytlačilová J., Chobot V., Jahodář L., Laakso I., Vuorela P. (2004): Short-term phototoxicity screening with *Artemia salina*, *Chem Inz Ekol*, **11**, 1233-1237; vyplývá, že na artemii byla hodnocena pouze mortalita. Nejvíce fotosenzibilizačně působil xantotoxin. Po 240 minutové expozici a spolupůsobení UVA dosáhl PIF = 2,88. Naopak bengálská červeň po 60 minutové i 240 minutové expozici měla fotoiritační faktor PIF ~1. Khellin byl fotosenzitivnější po 240 minutové expozici (PIF = 2,34) než po 60 minutové expozici (PIF = 1,01).

7.2.4. Thiofenový polyyn

Thiofenové polyyny se vyskytují především v čeledi Asteraceae. Patří mezi značně chemicky reaktivní sloučeniny (Jahodář & Klečáková, 1999). Intenzivně byla studována jejich fototoxicita, která je založena především na tvorbě singletového kyslíku (Towers et al., 1979; Constabel & Towers, 1989; Page et al., 1999, Chobot et al., 2006). Výsledky presentované v této práci ukazují vysoký fototoxický potenciál studovaného thiofenového derivátu, kdy již po 30 minutách ozařování vykázal vysokou mortalitu v porovnání s temnostními kontrolami. V experimentální skupině ozařované 120 minut se postupně vyrovnával počet mrtvých nítěnek s temnotními kontrolami. To ukazuje nejen na fototoxicitu této látky, ale i na toxicitu nezávislou na UV záření. Polyyny interreagují s organismem na různých orgánových i buněčných úrovních. Lineární polyyny např. poškozují funkci nervového systému blokací prereceptoru pro některé důležité neurotransmitery (Uwai et al., 2000).

Procento poškozených pokusných jedinců bylo vysoké už u jedinců po 15 minutové expozici thiofenovému polyynu. Zde paradoxně se toxicita výrazněji projevila u neozařovaných nítěnek. Polyyny snadno polymerizují v přítomnosti

kyslíku a UV záření. Tento jev mohl vést ke snížené biodostupnosti toxinu u ozařovaných jedinců. V experimentálních skupinách s delší dobou ozařování se výsledky počtu poškozených nítěnek změnila ve prospěch výraznější fototoxické aktivity.

Zde je zajímavé porovnat efekt uvedeného thifenového polyynu s jiným fototoxinem ze skupiny furokumarinů – xanthotoxinem. Xanthotoxin vykazoval evidentně nižší fototoxicitu v porovnání s polyynem. Tento rozdíl je pravděpodobně mimo jiné dán i jiným mechanismem tvorby reaktivních forem kyslíku. Thiofenové polyyny tvoří především singletový kyslík zatímco furokumariny (psoraleny) generují především superoxidový anionradikál (Chobot et al., 2006).

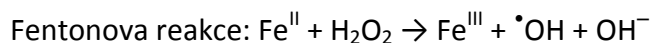
7.2.5. Jednoduché kumariny – umbelliferon, skopolin a skopoletin

Na kumariny lze z chemického hlediska pohlížet jako na laktony (vnitřní estery) kyseliny *o*-hydroxyskořicové anebo jako na deriváty 2-chromonu. Molekuly kumarinu se chovají dle reakčních podmínek jako obě entity. Kyslíkový heterocyklus se v alkalickém prostředí může otevřít ze vzniku volné kyseliny, na druhou stranu 2-chromonový heterocyklus je stabilizován rozsáhlou konjugací π elektronů.

Přestože kumariny mají výrazný chromofor a absorbují v UV oblasti, nelze očekávat výrazný přímý fotosenzibilizační efekt, protože excitační energie elektronu se přemění na záření o vyšší vlnové délce (Pape et al., 1994), což se projevuje výraznou fluorescencí, a dále pak přeměnou na rotační či vibrační pohyby molekul. Ojala et al., 1999 nezaznamenali žádnou fototoxicitu umbelliferonu na korýše *Artemia salina* ani po 20 h ozařování UVA. Výraznou fluorescenci bylo možné pozorovat pouhým okem v případě skopolinu a skopoletinu.

Studované kumariny obsahují hydroxylové nebo methoxylové skupiny na benzenovém jádře A molekuly. Tyto hydroxylové skupiny mají charakter fenolických, které jsou známy svou antioxidační aktivitou. Jednak jsou schopny přímo zhášet reaktivní volné radikály (Paya et al., 1992) a dále tvořit s ionty železa komplexy (Larson, 1988). Tato vlastnost se může zdát zvláště důležitá ve spojení s

poznatky, že přechodné kovy, kam železo patří, katalyzují Fentonovu reakci, při níž vznikají silné reaktivní a cytotoxické hydroxylové radikály ($\cdot\text{OH}$).



V organismu nítěnky se ionty železa mohou uvolňovat destruktivním působením singletového kyslíku na hemoglobin v hemolymfě. V tomto případě se projeví spíše fotoprotektivní efekt hydroxylovaných derivátů kumarinu. Souvirong et al., 2007 pozorovali inhibici peroxidace lipidů indukovaných UV zářením, tak i Fentonovu reakci skoparonem, který je 7-O-methylderivátem skopoletinu.

Kumariny např. skopoletin blokují vápníkové kanály v buňce (Oliviera et al., 2001), které se může projevit nepřirozenou relaxací svaloviny nítěnky a výrazně sníženou motilitou organismu. Epoxidace 3,4-násobné vazby v kyslíkatém heterocyklu B vede ke tvorbě toxického *o*-hydroxyphenylacetaldehydu a následným reakcím s dalšími molekulami jako jsou nenasycené mastné kyseliny, nukleové base a některé aminokyseliny (Lake, 1999). Tyto epoxidy vznikají metabolizací kumarinu cytochromy v mitochondriích buněk. Zvolna se zvyšující koncentrace uvedených epoxidů může vysvětlit opožděnou toxickou reakci nítěnek ke skopoletinu. Skopolin ani umbelliferon se neprojevovaly v experimentech toxicky. Skopolin pronikal špatně přes biologické membrány, protože se jedná o hydrofilní glykosid skopoletinu. Umbelliferon nepůsobil toxicky jednak snadnou glukuronizací (Lake, 1999) s následným rychlým vyloučením z organismu.

7.2.6. Salicylanilidy, thiosalicylanilidy

Halogenované salicylanilidy vykazují dva typy účinků souvisejících s ozářením. První je fototoxický účinek, tj. zánětlivá reakce po ozáření. Toto je důsledek chemického poškození tkání vlivem fotochemických procesů (poškození biologicky aktivních molekul reaktivními formami kyslíku), které jsou stimulovány fototoxickou látkou. Kromě toho halogenované salicylanilidy působí rovněž jako fotoalergeny. Zde jde o buňkami zprostředkovanou reakci pozdního typu, přičemž fotoalergen působí jako prohapten. K fotoalergizujícímu působení dochází uvolněním jednoho nebo více halogenových radikálů po ozáření UV zářením: volný

radikál reaguje s proteiny za vzniku nové molekuly, která může působit jako antigen *in vivo* (Harber et al., 1967).

3',4',5-trichlorsalicylanilid na rozdíl od 4',5-dibromsalicylanilid nevykázal žádnou toxicitu. 4',5-dibromsalicylanilid zvyšoval pouze mortalitu, která byla vyšší ve skupině ozařovaných jedinců po době expozice 15 minut. U organismu s delší dobou ozařování (30 a 60 minut) se výsledky mortality obrátily. Ozařované skupiny měly nižší mortalitu v porovnání s temnostními kontrolami. To bylo pravděpodobně způsobeno rozkladem testovaných látek vlivem UV záření. Halogenové substituenty se vyznačují silným záporným indukčním a kladným mezomerním efektem na elektrony benzenového cyklu uvedených sloučenin. Tím tyto substituenty ovlivňují vlastnosti látek včetně jejich stability a biodostupnosti, což vysvětluje i rozdíl v toxicitě obou salicylanilidů.

Thiosalicylanilidy vykazaly vyšší toxicitu ve srovnání se salicylanilidy. Toxicita thiosalicylanilidu závisela na typu substituentu. Halogenované deriváty působily jako silnější toxiny než ostatní thiosalicylanilidy. Také deriváty s větším počtem atomů halogenu v molekule měly toxičtější účinek. U thiosalicylanilidů bylo možné pozorovat stejný efekt jako u salicylanilidu, kdy toxicita ve skupině ozařovaných jedinců postupně klesala s délkou ozařování v porovnání s temnostními kontrolami. Opět i zde lze předpokládat rozklad látek vlivem UV záření a vliv typu a počtu substituentů na tento proces tak jak je patrné z prezentovaných výsledků měření.

Značná mortalita u jedinců temnostních kontrol vystavených účinkům 4',5-dibromsalicylanilidu a thiosalicylanilidu byla pravděpodobně způsobena schopností narušovat elektrontransportní děje v mitochondriích (Kubicova & Waisser, 1992; Waisser et al, 1998)

7.2.7. Antibiotika

Z testovaných antibiotik standard účinné látky amoxicilin vykázal slabé fototoxické působení (PIF = 1,14). Léčiva Augmentin a Ospamox tyto účinky neměly. O fototoxickém účinku amoxicilinu neexistuje mnoho dat (Kastalli et al., 2009). Je to

však známý alergen, ale žádná spojitost s UV zářením nebyla prokázána (Svensson et al., 2000). Nicméně vycházíme-li z faktu, že molekula amoxicilinu obsahuje benzenové jádro s hydroxylovou skupinou, nelze případné fotoalergizující účinky vyloučit. Test na nítěnce však nemůže fotoalergeny odhalit, protože jejich aktivita závisí na jiných faktorech než u klasických fotoiritujících látek.

Rozdíly v toxicitě mezi standardem amoxicilinu a přípravku s jeho obsahem je zřejmě dána vlivem pomocných látek, které ovlivňují biologickou dostupnost léčiva. Tyto pomocné látky se liší danou lékovou formou. Navíc různí výrobci používají i odlišné pomocné látky i u téhož druhu aplikační formy.

7.3. Využití nítěnky pro screening fotosenzibilizátorů v humánní toxikologii a možné využití v ekotoxikologii jako laboratorního testu

Dosažené výsledky ukazují, že existuje potenciál pro využití nítěnky v rámci „bioassay-guided“ izolace farmaceuticky významných rostlinných metabolitů či jiných přírodních nebo syntetických látek, které mohou vykazovat fotosenzibilizační aktivitu. Výhoda spočívá zejména ve využití nítěnky v první fázi screeningu. Nemusíme využívat tkáňové či buněčné kultury, tj. testy *in vitro*, ale od prvopočátku pracujeme s intaktním organismem (testy *in vivo*) a můžeme lépe zaznamenávat reakce celého organismu (změna chování, poškození atd.) na testovanou látku.

Díky kosmopolitnímu rozšíření, důležité součásti potravního řetězce, by se mohl stát také jedním z mnoha laboratorních testů, které by pomohly odhalit potenciální fotosenzibilizanty v životním prostředí.

Problémem zůstává obtížná definice a kvantifikace pokusného organismu (nemožnost určení stáří, pokud nítěnky nezískáme přímo z kokonu při laboratorním chovu) a tím i nutná synchronizace vývojových stádií, která je u laboratorních testů požadována. Další problém souvisí s možným místem výskytu – místo znečištěné, kontaminované. V tomto případě je třeba počítat s určitým časem na dekontaminaci, aby naše experimenty nebyly ovlivněny přítomností jiných xenobiotik, než těch, které chceme testovat.

8. Závěr

Záměrem této práce bylo využití kroužkovce *Tubifex tubifex* jako modelu pro testování biologické aktivity. Nítky byla v této studii použita pro hodnocení fotosenzibilizace, tj. zcitlivění organismu vůči UVA záření (365 nm; hustota zářivého toku $350 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) po styku s určitými látkami.

Testované látky zahrnovaly jednak prokázané fotosenzibilizátory: bengálskou červeň – standard při studiích aktivity potenciálních fotosenzibilizátorů, khelin – prakticky využíván v tzv. KUVA terapii, protože nemá fotosenzitivní erytematózní efekt na lidské kůži a xantotoxin – díky svým fotoreaktivním vlastnostem je rozsáhle využíván při léčbě lupénky, kožních forem T-buněčného lymfomu, vitiliga a některých fotodermatóz v rámci PUVA metody.

Pilotní studie ověřovaly citlivost modelového organismu vůči UVA záření ve spojitosti s prokázanými fotosenzibilizátory. Uvedené látky sloužily k navržení a propracování metodiky, která by mohla být využita pro další testování potenciálních fotosenzibilizátorů. Postup testování se skládal z přípravy modelového organismu, přípravy testovaných látek, vlastního testování, vyhodnocení výsledků a zhodnocení experimentu (statistické zpracování). Test probíhal ve 24jamkových destičkách, kde byla k 6 nítkám v každé jamce přidána testovaná látka nebo pouze deionizovaná voda (kontrola). Stejně byla uspořádána i destička, která sloužila jako tzv. temnostní kontrola a byla po celou dobu experimentu umístěna v termostatu ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) bez přítomnosti světla. Vyhodnocení probíhalo ihned po zvolené době ozařování (15, 30, 45, 60, 120, 240 min). Jako endpointy byla navržena mortalita a % poškozených jedinců.

Pro praktickou aplikaci a další propracování navrženého modelu testování bylo spektrum látek rozšířeno o přírodní izolované látky – thiofenový polyyn, umbelliferon, skopolin, skopoletin. O zástupce syntetických látek – salicylanilidy a thiosalicylanilidy a léčiva penicilinového typu Augmentin a Ospamox, jejich standard účinné látky amoxicilin. Závěrečné zhodnocení fotosenzibilizačních vlastností látek bylo provedeno dle Směrnice komise 2000/33/ES pro FOTOTOXICITY – ZKOUŠKY FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*.

Mezi prokázanými fotosenzibilizátory byl dosažen nejvyšší PIF faktor (5,72) u bengálské červeně po 30 minutovém ozařování a při hodnocení mortality. V případě hodnocení % poškozených jedinců byl PIF faktor 2,32. V dalších časech ozařování (60, 120, 240 min) byly dosaženy PIF < 5, což předpovídá neexistenci fototoxického potenciálu. Nejvyšší PIF faktor, ze všech testovaných látek, byl zjištěn u thiofenového polyynu. Při hodnocení mortality po 60 minutách ozařování byl dosažen PIF = 28,15 a při 120 minutách ozařování PIF = 57,5. Při výpočtu procenta poškozených jedinců byly získány hodnoty nižší – pro 60 min expozici PIF = 7,50 a pro 120 min expozici PIF = 18,57. Z uvedeného vyplývá, že thiofenový polyyn disponuje výrazným fotosenzibilizačním potenciálem i ve srovnání se standardem – bengálskou červení. Ostatní testované látky vykazovaly výrazně menší fotoiritační faktor, který se v případě khellinu – mortality a procenta poškozených jedinců pohyboval PIF < 2. U xantotoxinu bylo zjištěno pouze procento poškozených jedinců a PIF < 1,5. U umbelliferonu a skopolinu byla v rámci testovaných koncentrací a časů ozařování zaznamenána 0% mortalita a 0% poškozených jedinců. Pouze u skopoletinu bylo pozorováno 33 % poškozených jedinců při ozařování 120 minut. 3',4',5-trichlorsalicylanilid vykazoval v průběhu všech testů ve studovaných koncentracích a časech ozařování po expozici látky i v temnostních kontrolách 0% mortalitu a 0% poškozených jedinců. 4',5-dibromsalicylanilid vykazoval pouze mortalitu s PIF < 2. U základního thiosalicylanilidu byla zjištěna pouze mortalita a PIF < 2. V případě různých substitucí thiosalicylanilidu (4'-methylthiosalicylanilid, 5-chlorthiosalicylanilid, 3',4'-dichlorthiosalicylanilid, 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid, 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid) se pohyboval PIF < 1 pro hodnocení mortality. Poškození nítěnek bylo zaznamenáno pouze v případě 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid, 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid. U 3',4'-dichlorthiosalicylanilidu byla vypočtena vůbec nejnižší hodnota PIF = 0,02.

Prezentované výsledky ukazují, že nítěnka větší je vhodným testovacím organismem pro studium potencionálně fototoxických látek. Je dostatečně citlivá na aktivitu fotosenzibilizantu, zvláště pak látek generujících singletový kyslík.

9. Seznam použité literatury

- Abeysaker B.F., Abramowski Z., Towers G.H.N. (1983): Genotoxicity of the natural furanochromones, khellin and visnagin, and identification of a khellin-thymine photoadduct, *Photochem Photobiol*, **33**, 311-315
- Aufiero B.M., Talwar H., Young Ch. et al. (2006): Narrow-band UVB induces apoptosis in human keratinocytes, *J Photoch Photobio B*, **82**, 132-139
- Baldo L., Ferraguti M. (2005): Mixed Reproductive Strategy in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae)? *J Exp Zool*, **303A**, 168–177
- Birkhäuser B. (1962): The skin – photosensitizing furocoumarins, *Cell Mol Life Sci*, **18**, 153-161
- Bouché M.L., Biagianti-Risbourg S., Vernet G. (1999a): A light and scanning electron microscope study of the morphology of the chaetae of *Tubifex tubifex* in a non- polluted medium, *Hydrobiologia*, **411**, 39–44
- Bouché M.L., Biagianti-Risbourg S., Arzac F., Vernet G. (1999b): An original decontamination process developed by the aquatic oligochaeta *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead, *Aquat Toxicol*, **45**, 9–17
- Bouché M.L., Habets M.L., Biagianti-Risbourg S., Vernet G. (2000): Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic Oligochaete *Tubifex tubifex*, *Ecotox Environ Safe*, **46**, 246-251
- Brinkhurst R.O., Jamieson B.G.M. (1971): Aquatic Oligochaeta of the World, OLIVER & BOYD, Edinburgh, 860 s.
- Budesínský M., Vokác K., Harmatha J., Cvacka J. (2008): Additional minor ecdysteroid components of *Leuzea carthamoides*, *Steroids*, **73**, 502-514
- Chobot V., Vytlačilová J., Kubicová L., Opletal L., Laakso I., Vuorela P. (2006): Phototoxic activity of a thiophene polyacetylene form *Leuzea carthamoides*, *Fitoterapia*, **77**, 194-198
- Constabbel C.B., Towers G.H.N. (1989): The complex nature of the mechanism of toxicity of antibiotic dithiacyclohexadiene polyines (thiarubrines) from the Asteraceae, *Planta Med*, **55**, 35-37
- Coohill T.P. (1998): PHOTOBIOLOGY/PHOTOCHEMISTRY, *Int J Toxicol*, **17**, 559-565
- Csoma Z., Koreck A., Ignacz F. et al. (2006): PUVA treatment of the nasal cavity improves the clinical symptoms of allergic rhinitis and inhibic the immediate-type hypersensitivity reaction in the skin, *J Photoch Photobio B*, **83**, 21–26
- Červenka F. (2009): Bioassay guided separace metabolitů vybraného rostlinného druhu – *Evolvulus alsinoides*, disertační práce, Farmaceutická fakulta Univerzita Karlova v Hradci Králové, 136 s.

- Ditrichová D., Jírová D., Kolářová H., Kejlová K., Bendová H. (1999): Nežádoucí reakce kůže na sluneční záření a xenobiotika v životním prostředí, *Hygiena*, **44**, 102-109
- Dubakiene` R., Kupriene` M. (2006): Scientific problems of photosensitivity, *Medicina (Kaunas)*,**42**, 619-624
- Ebermann R., Alth G., Kreitner M., Kubin A. (1996): Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells, *J Photochem Photobiol B*, **36**, 95-97
- Egeler F., Römbke J., Meller M., Knacker Th., Nagel R. (1999): Bioaccumulation test with Tubificid Sludgeworms in artificial media – development of a standardisable method, *Hydrobiologia*, **406**, 271–280
- Eichlerová I., Homolka L., Benada O., Kofroňová O., Hubálek T., Nerud T. (2007): Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study, *Chemosphere*, **69**, 795-802
- Fini P., Castagnolo M., Catucci L., Cosma P., Agostiano A. (2004): Inclusion complexes of Rose Bengal and cyclodextrins, *Thermochim Acta*, **418**, 33-38
- Fischer B. B., Krieger-Liszka A., Eggen E.I.L. (2004): Photosensitizers Neutral Red (Type I) and Rose Bengal (Type II) Cause Light-Dependent Toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii* and Induce the *Gpxh* Gene via Increased Singlet Oxygen Formation, *Environ Sci Technol.*, **38**, 6307-6313
- Gillis P.L., Diener L.C., Reynoldson T.B., Dixon D.G. (2002): Cadmium-induced production of a metallothioneinlike protein in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Diptera): Correlation with Reproduction and Growth, *Environ Toxicol Chem*, **21**, 1836–1844
- Gillis P.L., Dixon D.G., Borgmann U., Reynoldson T.B., (2004a): Uptake and depuration of cadmium, nickel, and lead in laboratory-exposed *Tubifex tubifex* and corresponding changes in the concentration of a metallothionein-like protein, *Environ Toxicol Chem*, **23**, 76–85
- Gillis P.L., Reynoldson T.B., Dixon D.G. (2004b): Natural variation in a metallothionein-like protein in *Tubifex tubifex* in the absence of metal exposure, *Ecotox Environ Safe*, **58**, 22–28
- Girault J.P., Lafont R., Varga E. et al. (1988): Ecdysteroids from *Leuzea carthamoides*, *Phytochemistry*,**27**, 737-741
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem J*, **219**, 1-14

- Harber L. C., Targovnik S. E., Baer R. L. (1967): Contact photosensitivity patterns to halogenated salicylanilides in man and guinea pigs. *Arch Dermatol*, **96**, 646-656
- Hrabě S. (1981): Vodní máloštětinatci (Oligochaeta) Československa, *Acta Universitatis Carolinae - Biologica*, Praha, **1979**, 1–167
- <http://faf.vfu.cz/html/index2.html> [2007-09-20]
- Chen X., Kagan J. (1993): Photosensitized cleavage and cross-linking of pBR322 DNA with khellin and visnagin, *J Photochem Photobio. B*, **20**, 183–189
- Chobot V., Buchta V., Jahodářová H. et al. (2003): Antifungal activity of a thiophene polyine from *Leuzea carthamoides*, *Fitoterapia*, **74**, 288-290
- Jahodář L., Klečáková J. (1999): Toxicita hvězdnicovitých s přihlédnutím k farmaceuticky významným druhům, *Chem Listy*, **93**, 320-326
- Jahodář L. (2009): Farmakobotanika. Semenné rostliny, *Nakladatelství Karolinum*, Praha, 264 s.
- Jones P.A., King A.V. (2003): High throughput screening (HTS) for phototoxicity hazard using the in vitro 3T3 neutral red uptake assay, *Toxicol in Vitro*, **17**, 703–708
- Kaonga C.C., Kumwenda J., Mapoma H.T. (2010): Accumulation of lead, cadmium manganese, copper and zinc by sludge worms; *Tubifex tubifex* in sewage sludge, *Int J Environ Sci Tech*, **7**, 119-126
- Kastalli S., El Aidli S., Zaiem A., Lakhoua G., Daghfous R. (2009): Amoxicillin-induced phototoxicity, *Ann Dermatol Venereol*, **136**, 540-541
- Khangarot B.S., Rathore R.S., Singh B.B. (2003): pH-Dependent Toxicity of Heavy Metals to a Freshwater Sludgeworm *Tubifex tubifex* Müller, *B Environ Contam Tox*, **71**, 283–289
- Kim S.Y., Tak J.K., Park J.W. (2004): Inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by a singlet oxygen derived from photoactivated rose bengal, *Biochemie*, **86**, 501–507
- Kubicová L., Waissner K. (1992): Biologická aktivita salicylanilidů, *Česk Slov Farm*, **41**, s. 208
- Lake B.G. (1999): Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment, *Food Chem Toxicol*, **37**, 423-453
- Llano J., Raber J., Eriksson L.A. (2003): Theoretical study of phototoxic reactions of psoralens, *J Photochem Photobiol A*, **154**, 235–243
- Larson R.A. (1988): The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry*, **27**, 969-978

- Lasarow R.M., Isseroff R.R., Gomez E.C. (1992): Quantitative In Vitro Assessment of Phototoxicity by a Fibroblast-Neutral Red Assay, *J Invest Dermatol*, **98**, 725-729
- Lazim M.N., Learner M.A. (1987): The influence of sediment composition and leaf litter on the distribution of tubificid worms (Oligocheta). A field and laboratory study, *Oecologia*, **72**, 131–136
- Lelièvre D., Justine P., Christiaens F., Bonaventure N., Coutet J., Marrot L., Cotovio J. (2007a): The episkin phototoxicity assay (EPA): Development of an *in vitro* tiered strategy using 17 reference chemicals to predict phototoxic potency, *Toxicol in Vitro*, **21**, 977-995
- Lelièvre D., Justine P., Christiaens F., Bonaventure N., Coutet J., Marrot L., Cotovio J. (2007b): The EPISKIN Phototoxicity Assay (EPA): Development of an *in vitro* tiered strategy to predict phototoxic potential, *AATEX*, **14** Special Issue, 389-396
- Lellák J., Kořínek V., Fott J., Kořínková J., Punčochář P. (1982): Biologie vodních živočichů, skriptum Univerzity Karlovy v Praze, 220 s.
- Lovell W.W., Jones P.A. (2000): An evaluation of mechanistic *in vitro* tests for the discrimination of photoallergic and photoirritant potential, *ATLA Altern Lab Anim*, **28**, 707-724
- Malina L. (1999): Fotodermatózy, MAXDORF Praha, 205 s.
- Mikro-verze AISLP – ČR 2008.1 pro MS Windows
- Miller J.S. (2005): Rose bengal-sensitized photooxidation of 2-chlorophenol in water using solar simulated light, *Water Res*, **39**, 412-422
- Misra R.B., Joshi P.C. (1999): Phototoxicity evaluation – *Tetrahymena thermophila* as an alternative model, *Indian J Exp Biol*, **37**, 750-757
- Misra R.B., Babu G.S., Ray R.S., Hans R.K. (2002): Tubifex: A Sensitive Model for UV-B-Induced Phototoxicity, *Ecotox Environ Safe*, **52**, 288-295
- Morgan, D. D., Warshawsky, D. (1977): The photodynamic immobilization of *Artemia salina* nauplii by polycyclic aromatic hydrocarbons and its relationship to carcinogenic activity, *Photoch Photobio*, **25**, 39–46
- Mosleh Y.Y., Paris-Palacios S., Couderchet M., Biagianti-Risbourg S., Vernet G. (2005): Metallothionein induction, antioxidative responses, glycogen and growth changes in *Tubifex tubifex* (Oligochaete) exposed to the fungicide, fenhexamid, *Environ Pollut*, **135**, 73-82

- Mosleh Y.Y., Paris-Palacios S., Biagianti-Risbourg S. (2006): Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper, *Chemosphere*, **64**, 121–128
- Mothilal K.K., J. Inbaraj J.J., Gandhidasan R., Murugesan R. (2004): Photosensitization with anthraquinone derivatives: optical and EPR spin trapping studies of photogeneration of reactive oxygen species, *J Photochem Photobiol*, **162**, 9-16
- OECD Guideline 432, *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test
- Ojala, T., Vuorela, P., Kiviranta, J., Vuorela, H., Hiltunen, R. (1999): A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins, *Planta Med*, **6**, 715–718
- Oliviera E.J., Romero M.A., Silva M.S., Silva B.A., Medeiros I.A. (2001): Intracellular calcium mobilization as a target for the spasmolytic action of scopoletin, *Planta Med.*, **67**, 605-608
- Page J.E., Block E., Towers G.H.N. (1999): Visible-light photochemistry and phototoxicity of thiarubrines, *Photochem Photobiol*, **70**, 159-165
- Pape W., Pfannenbercker U., Diembeck W. (1994): A Strategic Approach for *In Vitro* Phototoxicity Testing, In: Alternative methods in Toxicology, Vol. 10, *In Vitro* skin Toxicology: Irritation, Phototoxicity, Sensitization (Rouriger A., Goldberg A.M., Maibach H.I. eds.), New York, Mary Ann Leibert, 203-212
- Pathak M.A., Fitzpatrick T.B. (1992): The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD, *J Photochem Photobiol B*, **14**, 3-22
- Paya M., Halliwell B., Houlst J.R.S. (1992): Interactions of a series of coumarines with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radical, *Biochem Pharmacol*, **44**, 205-214
- Pfannkuche O. (1981): Distribution, abundance and life cycles of aquatic Oligochaeta (Annelida) in a freshwater tidal flat of the Elbe Estuary, *Archiv für Hydrobiologie Suppl.* **43**, 506–524
- Prenda J., Gallardo A. (1992): The Influence of Environmental Factors and Microhabitat Availability on the Distribution of an Aquatic Oligochaete Assemblage in a Mediterranean River Basin, *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, **77**, 421–434
- Píš J., Buděšínský M., Vokáč K., Laudová V., Harmatha J. (1994): Ecdysteroids from the roots of *Leuzea carthamoides*, *Phytochem*, **37**, 707-711
- Rajendran M., Gandhidasan R. Murugesan R. (2004): Photosensitisation and photoinduced DNA cleavage by four naturally occurring anthraquinones, *Photochem Photobiol A*, **168**, 67-73

- Rathore R.S., Khangarot B.S. (2002): Effects of Temperature on the Sensitivity of Sludge Worm *Tubifex tubifex* Müller to Selected Heavy Metals, *Ecotox Environ Safe*, **53**, 27-36
- Ribeiro F.A.L., Ferreira M.M.C. (2005): QSAR model of the phototoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons, *THEOCHEM*, **719**, 191-200
- Rodriguez P., Martinez-Madrid M., Arrate J.A., Navarro E. (2001): Selective feeding by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* (Tubificidae, Clitellata), *Hydrobiologia*, **463**, 133-140
- Rulík M., Wohlgemuth E. (1996): Temporal and vertical distribution of Oligochaeta in hyporheic zone of Morava river (Czech republic), *ACTA UNIVERSITATIS PALACKIANAE OLOMUCENSIS, FACULTAS RERUM NATURALIUM, BIOLOGIA* **34**, 35–46
- Sedlák E. (2003): Zoologie bezobratlých, skriptum Masarykovy univerzity v Brně, 337 s.
- Smutná M., Hilscherová K., Pašková V., Maršálek B. (2008): Biochemical parameters in *Tubifex tubifex* as an integral part of complex sediment toxicity assessment, *J Soils Sediments*, **8**, 154–164
- SMĚRNICE KOMISE 2000/33/ES ze dne 25.dubna 2000, kterou se po dvacáté sedmé přizpůsobuje technickému pokroku směrnice Rady 67/548/EHS o sblížení právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek, 30 s.
- Soni A. K., Joshi P. C. (1997): High Sensitivity of *Tubifex* for Ultraviolet- B, *Biochem Biophys Res Commun*, **231**, 818–819
- Sourivong P., Schronerova K., Babincova M. (2007): Scoparone inhibits ultraviolet radiation-induced lipid peroxidation, *Z Naturforsch*, **62c**, 61-64
- Slováková L., Šimaljaková M. (2009): Využitie ultrafialového žiarenia v dermatológii, *Dermatol prax*, **3**, 125-127
- Svensson C.K., Cowen E.W., Gaspari A.A. (2000): Cutaneous Drug Reactions, *Pharmacol Rev*, **53**, 357-379
- Stone R.G. (2005): The effects of x-rays on anterior regeneration in *Tubifex tubifex*, *J Morphol*, **54**, 303–320
- Thorp J.H., Covich A.P. ed. (2001): Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates, 2nd Edition Academic Press, USA, 1056 s.
- Tichý M., Rucki M. (1996): Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*, *Pracov Lék*, **48**, 225-230

- Tichý M., Rucki M., Hanzlíková I., Roth Z. (2007): The *Tubifex tubifex* Assay for the Determination of Acute Toxicity, *ATLA*, **35**, 229–237
- Tichý M., Rucki M., Hanzlíková I., Roth Z. (2008): Acute Toxicity Estimation by Calculation – *Tubifex* Assay and Quantitative Structure-Activity Relationships, *Environ Toxicol Chem*, **27**, 2281-2286
- Timm T. (1984): Potential age of aquatic Oligochaeta, *Hydrobiologia*, **115**, 101–104
- Tomko J. et al. (1999): Farmakognózia, 2. vydání, Martin, Osveta, 422 s.
- Toyooka T., Ibuki Y. (2006): New Method for Testing Phototoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Environ Sci Technol*, **40**, 3603–3608
- Towers G.H.N., Arnarson T., Wat C.K., Graham E.A., Lam J., Mitchell J.C. (1979): Phototoxic polyacetylenes and their thiphenes derivatives (effects on human skin), *Contact Dermatitis* **5**, 140-144
- Trumble J.T., Moar W.J., Brewer M.J., Carson W.G. (1991): Impact of UV radiation on activity of linear furanocoumarins and *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* against *Spodoptera exigua*: Implications for tritrophic interactions, *J Chem Ecol*, **17**, 1573-1561
- Urbach F. (1998): Historical aspect of Phototoxicology, *Int J Toxicol*, **17**, 537-540
- Uwai K., Ohashi K., Takaya Y. et al. (2000): Exploring the structural basis of neurotoxicity in C₁₇-polyacetylenes isolated from water hemlock, *J Med Chem*, **43**, 4508-4515
- Veith G.D., Mekenyan O.G., Ankley G.T., Call D.J. (1995): A QSAR analysis of substituent effects on the photoinduced acute toxicity of PAHs, *Chemosphere*, **30**, 2129–2142
- Vuorela H., Vuorela P., Tornquist K., Alaranta S. (1997): Calcium channel blocking activity: Screening methods for plant derived compounds, *Phytomedicine*, **4**, 167-180
- Vytlačilová J., Chobot V., Jahodář J., Laakso I., Vuorela P. (2004): Short-term phototoxicity screening with *Artemia salina*, *Chem Inz Ekol* **11**, 1233-1237
- Wade A.M, Tucker H.N. (1998): Antioxidant characteristics of L-histidine, *J Nutr Biochem*, **9**, 308-315
- Waisser K., Bureš O., Holý P. a kol. (2001): Antimykobakteriální a antimykotická aktivita látek podobných salicylanilidům, *Chem Listy*, **95**, 742-778
- Waisser K., Bureš O., Holý P. a kol. (2003): Relationship between structural and antimykobacterial activity of substituted salicylanilides, *Arch Pharm Med Chem*, 336, s. 53

10. Seznam příloh

PŘÍLOHA 1 : Chobot V., Vytlačilová J., Jahodář L. (2004): Phototoxic activity and the possibilities of its testing, *Cent Eur J Publ Health, Suppl*, **12**, S31 - S33

PŘÍLOHA 2 : Vytlačilová J., Chobot V., Jahodář L., Laakso I., Vuorela P. (2004): *Tubifex tubifex* Müll. – photosensitive organism, *Cent Eur J Publ Health, Suppl*, **12**, S89–S93

PŘÍLOHA 3 : Vytlačilová J., Chobot V., Karlíčková J., Jahodář L., Opletal L., Pour M. (2003): *Tubifex tubifex* – a sensitive organism to the activity of phototoxins, *Folia Pharm. Univ. Carol.*, **29-30**, 107–111

PŘÍLOHA 4 : Chobot V., Vytlačilová J., Kubicová L., Opletal L., Jahodář L., Laakso I., Vuorela P. (2006): Phototoxic activity of a thiophene polyacetylene from *Leuzea carthamoides*, *Fitoterapia*, **77**, 194-198

PŘÍLOHA 5 : Vytlačilová J., Chobot V., Jahodář L., Laakso I., Vuorela P. (2004): Short-term phototoxicity screening with *Artemia salina*, *Chem Inz Ekol*, **11**, 1233-1237